BIOCHEMISCHE UND ELEKTRONEN-MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER REPLIKATIVE STRUKTUREN IN DER DNA VON EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Siegmar R. Bäzner

aus Pforzheim

1982

BIOCHEMISCHE UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER REPLIKATIVE STRUKTUREN IN DER DNA VON EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN

BIOCHEMISCHE UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER REPLIKATIVE STRUKTUREN IN DER DNA VON EHRLICH-ASCITES-TUMORZELLEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Siegmar R. Bäzner
aus Pforzheim

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.2.1982

Dekan : Prof. Dr. E. Reinhard

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Probst

2. Berichterstatter : Prof. Dr. K. Eisele

für meine Eltern,

deren geduldige Unterstützung
mir die Durchführung dieser
Arbeit ermöglichte,
und für

Filareti, Eva und Iris

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. H. Probst
am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt. Herrn Prof. Dr. H. Probst möchte ich an dieser Stelle für die ständige Betreuung meiner Arbeit, sowie seine großzügige Förderung danken.
Prof. Dr. W. Beermann und Dr. E. Spindler vom Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen danke ich für die Überlassung von Digitizer und Tischcomputer zur statistischen Verarbeitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
Herrn Eichele und seinen Mitarbeitern von der feinmechanischen Werkstatt des Instituts bin ich für viele Konstruktionshinweise und für die Fertigung wissenschaftlicher Apparate verpflichtet.

Abstract

Bäzner, Siegmar:

Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen über replikative Strukturen in der DNA von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Es wurden Untersuchungen über die Beziehung von inverted repeat Sequenzen (i.r.) zum Replikationsursprung (Initiationsstellen) in unseren Ascites-Tumorzellen durchgeführt. Nach Aufhebung einer Initiationshemmung mit O_2-Entzug wurde neusynthetisierte DNA 5 Min Puls-markiert, und die in dieser DNA enthaltenen i.r.Sequenzen mit denen einer gleichmäßig ^{14}C-markierten DNA verglichen. Durch diese "spezifische Markierung" der Initiationsregionen wurden erheblich mehr i.r. Sequenzen ^{3}H markiert, als in der Referenz für die allgemeine Zell-DNA, was darauf hinweist, daß die Replikation in Ascites-Zellen nicht stochastisch initiiert wird, sondern zumindest teilweise an spezifische, symmetrische (i.r.) Sequenzen gebunden ist.

Die i.r.Sequenzen in Ascites-Zellen wurden elektronenmikroskopisch dargestellt und statistisch ausgewertet. Dabei ergab sich bei einer mittleren Fragmentlänge von 6,6 kb eine mittlere Länge für i.r. Sequenzpaare von 0,78 kb und für Loop-Längen von 1,7 kb. Die Gesamtzahl der i.r.Sequenzpaare pro Ascites-Genom, von denen 85% ein Loop enthalten, wurde mit 20.500 pro Meter DNA errechnet.

Außerdem wurden aus dichtemarkierter Ascites-DNA nach stochastischer Fragmentierung durch Kryolyse replikative Strukturen durch Nitrocellulosechromatographie angereichert und in isopyknischen Gradienten aufgetrennt. Aus allen Fraktionen der CsCl-Gradienten wurden quantitative, elektronenmikroskopische Messungen an den erhaltenen linearen und verzweigten Strukturen durchgeführt. Die beobachteten ein- und zweifach verzweigten Strukturen wurden als "laufende Replikationsgabeln", Initiations- und Terminationsstrukturen gedeutet. Das für einfach verzweigte Y-Strukturen gemessene ca. 3-fache Molekulargewicht gegenüber linearen, nicht an Nitrocellulose bindenden DNA-Fragmenten, bestätigt ebenso wie die Exponentialverteilung aller Fragmente theoretische Annahmen zum Fragmentierungsprinzip der Kryolyse.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Biologisches Material	7
2.1.1	Ehrlich-Ascites-Tumorzellen	7
2.1.2	Escherichia coli (λ p lac 5)	7
2.2	Entnahme der Ascites-Zellen	7
2.3	DNA-Markierungen	8
2.3.1	Langzeitmarkierung mit ^{14}C-Thymidin	8
2.3.2	Puls- und Puls/Chase-Markierung mit ^{3}H-Thymidin	8
3.3.3	"Spezifische" Markierung der Initiationsregionen	8
2.3.4	Dichtemarkierung mit 5-Brom-desoxy-Uridin	9
2.4	Isolierung von Ascites-DNA	10
2.4.1	Puffer, Lösungen, Enzyme	10
2.4.2	Herstellung von Zellkernen	10
2.4.3	Standard-DNA-Aufarbeitung	11
2.4.4	DNA-Reinigung über präparative CsCl-Gradienten	11
2.4.5	Entproteinisierung bei hoher Ionenstärke	12
2.5	Isolierung von λ p lac 5 - DNA	12
2.5.1	Medium und Agarplatten	12
2.5.2	Lagerung der Bakterien	12
2.5.3	Gewinnung von Phagen und Isolierung der DNA	12
2.5.4	Herstellung ^{14}C-markierter λ-DNA	13
2.6	Andere Nucleinsäuren	14
2.7	Isopyknische Zentrifugation	14
2.7.1	$Ag^{+}/CsSO_4$ Satellitabtrennung	14
2.7.2	Auftrennung dichtemarkierter DNA	15
2.8	Fragmentierung von Ascites-DNA	15
2.8.1	Ultraschallbehandlung	15
2.8.2	Hydrodynamischer Scher	15
2.8.3	Kryolyse nach Lyskov und Moshkovsky	15
2.9	Verdauung von Phagen-DNA mit Endo Eco R I	16

		Seite
2.10	Nitrocellulose-Chromatographie	16
2.11	Hydroxylapatit-Chromatographie	17
2.11.1	Puffer, Säulenmaterial, cot-Werte	17
2.11.2	HAP-Säulenchromatographie mit kontinuierlichen Gradienten	18
2.11.3	HAP-Zentrifugationstechnik	18
2.11.4	HAP-Säulenchromatographie mit Stufengradienten	19
2.12	Radioaktivitätsbestimmungen	19
2.12.1	Szintillatoren, Lösungsvermittler, Filter	19
2.12.2	Säurefällbare Radioaktivität in DNA-Lösungen	20
2.12.3	Eingebaute Radioaktivität aus ganzen Zellen	20
2.12.4	Probenbehandlung für spezielle Zählprobleme	20
2.13	Zonensedimentation im Rohrzuckergradienten	21
2.14	Agarosegel-Flachbett-Elektrophorese	22
2.14.1	Elektrophorese-Geräte	22
2.14.2	Puffer, Lösungen, Materialien	24
2.14.3	Durchführung der Elektrophorese	24
2.15	Elektronenmikroskopische Methoden	25
2.15.1	Materialien	25
2.15.2	Lösungen	26
2.15.3	Probenvorbereitung für die Elektronen-Mikroskopie	27
2.15.4	Herstellung befilmter Objektträgernetze	28
2.15.5	DNA-Präparationsmethoden	28
2.15.5.1	Tropfenspreitungsmethode	28
2.15.5.2	Isodenaturierungsmethoden	29
2.15.5.3	Diffusionsmethode	29
2.15.6	Färbung und Bedampfung	30
2.15.7	Elektronenmikroskopie und Dokumentation	30
2.15.8	Informationsverarbeitung	31

3	BESTIMMUNG VON MOLEKULARGEWICHTEN UND MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNGEN MIT ELEKTROPHORESE, SUCROSEGRADIENTENZENTRIFUGATION UND ELEKTRONENMIKROSKOPIE	32
3.1	Vorbemerkungen	32
3.2	Molekulargewichtsbestimmungen mit Agarosegelelektrophorese	33
3.3	Molekulargewichtsbestimmung durch Sucrosegradientenzentrifugation	36
3.4	Elektronenmikroskopische Molekulargewichtsbestimmung	39
3.5	Molekulargewichtsverteilung von Kryolyse-Fragmenten	43
4	"INVERTED REPEAT" - SEQUENZEN UND IHRE BEZIEHUNG ZUM REPLIKATIONS-URSPRUNG	47
4.1	Einleitung	47
4.2	Methodische Probleme bei der Anreicherung von i.r.Sequenzen aus Ascites-Hauptbanden-DNA	52
4.2.1	Satellit-DNA Abtrennung	53
4.2.2	Fragmentierung der DNA und Molekulargewichtsanalysen	55
4.2.3	Hydroxylapatit-Chromatographie	57
4.2.4	Vorbereitung der fold back DNA zur Elektronenmikroskopie	63
4.3	Radioaktive Markierung von i.r.Sequenzen	65
4.3.1	Vorbemerkungen	65
4.3.2	Puls/Chase Markierungen	67
4.3.3	"Spezifische" Markierung der Initiationsregion	72
4.4	Elektronenmikroskopische Studie von Ascites-Hauptbanden fold back DNA	79
4.4.1	Beurteilung der in der fold back DNA beobachteten Strukturen	79
4.4.2	Abschätzung der Häufigkeit von i.r.Sequenzen im Ascites-Genom	84

5	ELEKTRONENMIKROSKOPISCH KONTROLLIERTE ANREICHERUNG REPLIZIERENDER DNA	87
5.1	Vorbemerkungen	87
5.2	Methodische Probleme der Anreicherung und Elektronenmikroskopie von Replikationsstrukturen	88
5.3	Quantitative Untersuchungen an neusynthetisierter, dichtemarkierter DNA aus verschiedenen Fraktionen eines CsCl-Gradienten	98
5.4	Diskussion	102
6	ZUSAMMENFASSUNG	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	107
	Lebenslauf	113
	Akademische Lehrer	114

Abkürzungen

EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
HAP	Hydroxylapatit
IPM	Impulse pro Minute
i.r.	inverted repeat
NC	Nitrocellulose
PB	Na-Phosphatpuffer pH 7
SDS	Na-Dodecylsulfat
SSC	Standard Na-Citrat Puffer (0,15 M NaCl, 0,15 M Na_3-Citrat)
ss-DNA	einsträngige DNA
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UPM	Umdrehungen pro Minute
ZPM	Zerfälle pro Minute

Wofür arbeitet ihr ?

Ich halte dafür, daß das einzige Ziel der Wissenschaft darin besteht, die Mühseligkeit der menschlichen Existenz zu erleichtern. Wenn Wissenschaftler, eingeschüchtert durch selbstsüchtige machthaber, sich damit begnügen, Wissen um des Wissens willen aufzuhäufen, kann die Wissenschaft zum Krüppel gemacht werden, und eure Maschinen mögen nur neue Drangsale bedeuten. Ihr mögt mit der Zeit alles entdecken, was es zu entdecken gibt, und euer Fortschritt wird doch nur ein Fortschreiten von der Menschheit weg sein. Die Kluft zwischen euch und ihr kann eines Tages so groß werden, daß euer Jubelschrei über irgendeine neue Errungenschaft von einem universalen Entsetzensschrei beantwortet werden könnte.

Bertolt Brecht

Im Januar 1939 erscheinen in "Die Naturwissenschaften" und im Februar in "Nature" Artikel von Otto Hahn über die Spaltung der Uranatome. Bertolt Brecht erfährt davon über Zeitungsberichte im dänischen Exil und schreibt daraufhin sein "Leben des Galilei".

1. EINLEITUNG

In den letzten 10 Jahren wurde das Wissen um die identische Reduplikation der Erbsubstanz in eucaryontischen Zellen stark vermehrt (1-4). Als wesentlicher Unterschied zu Procaryonten imponierte die Tatsache, daß die Replikation der cm-langen DNA-Moleküle gleichzeitig an vielen Startpunkten ("Origin") auf demselben Chromosom initiieren kann.

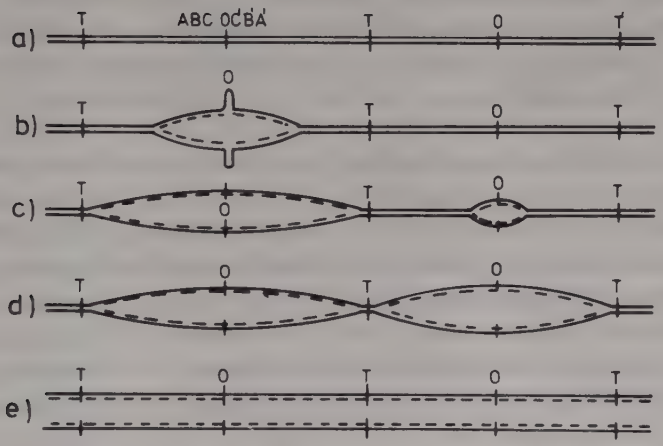


Abb. 1.1 Bidirektionales Modell der eucaryontischen DNA-Replikation modifiziert nach Hubermann und Riggs (5): — Parentalstrang,----Tochterstrang, O Initiationspunkt T Terminationspunkt, ABC-C'B'A' "inverted repeat"-Sequenz, nur an einem Initiationspunkt eingezeichnet.
a) vor der Replikation
b) Replikation der linken Replikationseinheit (RE)
c) Replikation der rechten RE, linke RE am Terminationspunkt beendet.
d) Beide REs an Terminationspunkten angelangt
e) Replikation an beiden Parentalsträngen beendet, die Tochterhelices haben sich an gemeinsamen Terminationspunkten getrennt.

Durch faserautoradiographische (6,7) und elektronenmikroskopische (8-10) Beobachtungen gestützt wurde ein Modell der DNA-Replikation vorgeschlagen, bei dem nach lokaler Aufwindung und Aufschmelzung der DNA an Initiationspunkten die Parentalstränge bidirektional durch 2 sich voneinander fortbewegende Gabeln repliziert werden. Die so entstehenden Parental-Tochterstrangpaare bilden Blasen oder Schleifen, die miteinander zu größeren Blasen verschmelzen, bis die gesamte DNA repliziert ist (11,12).

Der letztgenannte Vorgang wird allgemein als "DNA-Reifung" oder auch als "Termination" bezeichnet. Initiation, sowie Termination sind selbständige Vorgänge, die klar gegen die eigentliche Replikation an einer laufenden Gabel abgrenzbar sind (2,11). Bei der Initiation ist eine Reihe spezifischer Proteinfaktoren beteiligt, sie steht unter regulatorischer Kontrolle (s.u.). Vieles deutet darauf hin, daß die Spuren eines Initiationsvorganges auf der neuen DNA noch faßbar sind, wenn sich die Replikationsgabeln schon erheblich vom Origin entfernt haben (130). Die Termination oder Reifung läuft keineswegs automatisch ab, wenn zwei Gabeln an den Grenzen benachbarter Replikons aufeinandertreffen. Die reife Tochter-DNA wird erst mit einer Verzögerung in der Größenordnung von Stunden (Wartezeit) fertiggestellt. Die Dauer der Wartezeit unterliegt offensichtlich auch regulatorischen Einflüssen (36).

Inzwischen sind Teilaspekte dieses Ablaufs an vielen Eucaryonten überprüft worden. Über die Größe der Replikationseinheiten (Replikons) liegen über viele Spezies genauere Daten vor (4); sie schwanken in differenzierten Säugerzellen um Mittelwerte von 17 (12) bis 84 (13) µm.
Die Replikationsgeschwindigkeit, oder genauer gesagt die Geschwindigkeit, mit der sich eine Replikationsgabel vom Initiationspunkt fortbewegt, liegt für Säugerzellen in einem engen Bereich zwischen 0,5 und 1,8 µm/Min x Gabel (4). Die Gabelgeschwindigkeit kann zellzyklusabhängig, genetisch und metabolisch reguliert werden. Die Regulation der S-Phasen-Dauer scheint aber nicht wesentlich über die Gabelgeschwindigkeit zu erfolgen, sondern sie wird über die Anzahl der

neu initiierten Replikons kontrolliert (11,12). Beispielsweise beobachtete Blumenthal et al. (8) bei Drosophila-Embryonen mit einer S-Phasen-Dauer von 3 bis 4 Minuten im Elektronenmikroskop ein Blasenmuster der DNA mit Interinitiationsabständen von 3 µm. Im selben differenzierten Zellsystem verlängerte sich die S-Phase auf 10 Stunden, die Interinitiationsabstände konnten nur noch autoradiographisch beobachtet werden, aber die Gabelgeschwindigkeit änderte sich nicht. Eine Variation der Zahl der replizierenden Einheiten kann nicht nur durch eine Änderung der Abstände der Initiationspunkte erfolgen, sondern auch dadurch, daß unterschiedlich große Gruppen von Replikationseinheiten durchschnittlicher Größe aktiviert werden. Diese Annahme wird durch Experimente von Hand und Tamm (7,13) und R. Blütters (15) gestützt, die zeigten, daß die Initiation benachbarter Replikationseinheiten innerhalb eines Stranges fast synchron erfolgt.

Die physikalischen Eigenschaften eucaryontischer Replikationsursprünge sind bislang wenig erforscht. Das einfachste regulierte Modell fordert spezifische DNA-Sequenzen, die als Erkennungsstellen für Proteine der DNA-Replikation dienen, ähnlich den procaryontischen Origin-Regionen (16). Da die DNA-Replikation von den meisten Startpunkten aus bidirektional abläuft, sollte man erwarten, daß diese Sequenzen ein Symmetriezentrum haben, wie dies bei Palindromen und "inverted repeats" (i.r.)[1] gegeben ist. Diese Forderungen sind im

1) Ein Palindrom ist ein Wort oder eine Sequenz, das in beiden Richtungen gelesen werden kann. Der Begriff Palindrom wird häufig für kurze (Oligonucleotide), zweifach rotationssymmetrische doppelsträngige DNA-Abschnitte angewandt. Der Ausdruck "inverted repeat" findet bei langen Palindromen (mehrere 100 Nucleotide) Anwendung. Im deutschsprachigen Schrifttum wird er unglücklich mit "invers repetitiv" übersetzt. Unter repetitiven DNA-Abschnitten versteht man jedoch Sequenzen, die sich viel häufiger als 2 Mal auf dem Genom wiederholen. Ich habe mich deshalb entschlossen den englischen Ausdruck beizubehalten.

A-A-T-T-G - C-A-A-T-T
T-T-A-A-C - G-T-T-A-A

komplexen eucaryontischen Genom jedoch nicht einfach zu überprüfen. Stinchcomb et al (17,18) gelang es zwar, aus Hefe, Drosophila, Mais und 3 weiteren höheren Eucaryonten Restrictionsfragmente zu isolieren, die, in Plasmide eingeschlossen, diesen die Fähigkeit zur autonomen extrachromosomalen Replikation verliehen. Der Nachweis, daß diese Sequenzen die Eigenschaft zur spezifischen Initiation der Replikation besitzen, wurde durch recombinante DNA-Methoden mit einer Hefedeletionsmutante geführt. Biochemische oder elektronenmikroskopische Beweise stehen jedoch noch aus. Da bislang eucaryontische Replikationseinheiten nur funktionell definiert sind, stützt sich die Hypothese, daß ihre Replikationsursprünge i.r.Sequenzen enthalten sollen, auf entsprechende positive Befunde bei vielen Säugerviren (79-90).
Ausserdem ist seit langem bekannt, daß eucaryontische DNA i.r. Sequenzen enthält, die etwa 1% des Gesamtgenoms ausmachen (19). Diese Sequenzen können durch Denaturierung und Renaturierung bei cot-Werten unter 10^{-4} mit Hydroxylapatit-(HAP) Chromatographie von der Gesamt-DNA abgetrennt werden. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der radioaktiven Markierung, Anreicherung und elektronenmikroskopischen Charakterisierung solcher i.r.Sequenzen in unseren Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (Abschnitt 4). Vor allem sollte durch die Wahl entsprechender Markierungsbedingungen der Nachweis geführt werden, daß in neu initiierenden Replikons überproportional viele i.r. Sequenzen Radioaktivität tragen. Dies wäre ein indirekter Hinweis auf eine Beteiligung von i.r.Sequenzen an der Initiation der Replikation.

Nach dem oben dargestellten Modell der Organisation der Replikation in Eucaryonten ist in replizierenden Zellen das Auftreten verschiedener replikationsspezifischer ("replikativer") DNA-Strukturen wie Replikationsgabeln, Initiationsstrukturen und Terminations- bzw Reifungsstrukturen zu erwarten (Abb. 1.2). Werden replizierende Zellen mit einer markierten DNA-Vorstufe inkubiert, so durchläuft die eingebaute Markierung in gesetzmäßiger Weise die replikativen Strukturen.

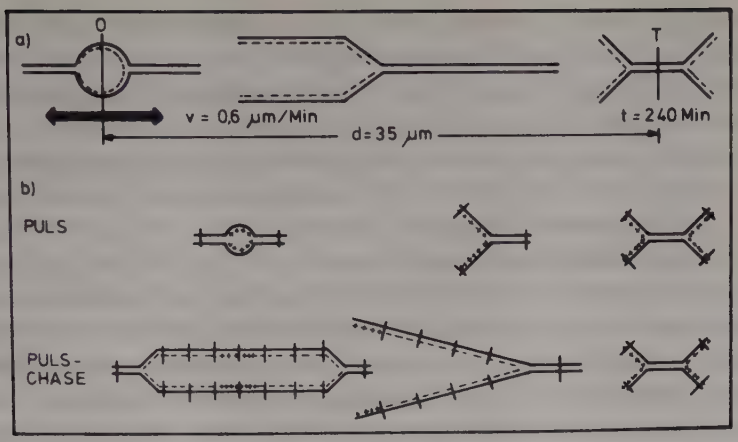


Abb. 1.2 Replikationsstrukturen und replikative Fragmente
Erläuterungen im Text; ——— Parental-DNA ;
--- Tochterstrang DNA (Es ist die Situation für ein Puls/Chase-Expt. dargestellt); +++ radioaktiv markierte Tochterstrang DNA; O = Initiationsstruktur
T = Terminationsstruktur, t = Wartezeit, v = Gabelgeschwindigkeit, d = 1/2 Replikonlänge (52,105).
Die durch Kryolyse oder einen anderen Fragmentierungsprozess entstehenden Fragmente sind durch senkrechte Striche angedeutet.

In Abb. 1.2b sind die Verhältnisse für ein sogenanntes Puls/Chase-Experiment dargestellt. Die Markierung wird nur für kurze Zeit durchgeführt ("Puls"), danach werden die Zellen in Abwesenheit des Markers eine Zeitlang weiterwachsen lassen ("Chase"). Am Ende des Pulses und zu einem oder mehreren Zeitpunkten des Chases werden Proben zur Untersuchung der DNA genommen. Wie aus Abb. 1.2b hervorgeht bleibt bei markierten Initiations- und Terminationsstrukturen die Markierung mit ihnen assoziiert, solange diese Strukturen überhaupt faßbar sind. Eine Replikationsgabel hingegen läuft von der Markierung weg.

Fragmentiert man die DNA replizierender Zellen, so entstehen Fragmente mit replikativen Strukturen ("replikative Fragmente") neben stark überwiegenden "normalen" DNA-Fragmenten ("nicht replikative Fragmente", bulk-DNA Fragmente). Man kann

Computermodelle konstruieren (129), die den Durchsatz an Markierung durch die diversen replikativen Strukturen beschreiben und die es gestatten, die Markierung in den replikativen Fragmenten zu jedem Zeitpunkt eines Experimentes vorauszusagen, wenn mit hinreichender Genauigkeit bekannt ist:

- der zeitliche Verlauf der Inkorporation der Markierung in DNA (Einbaukurve),
- die Fragmentgrößenverteilung.

Darüberhinaus muß gefordert werden, daß der Fragmentierungsprozess keine Unterschiede zwischen replikativen und nicht replikativen Strukturen macht. Wenn es gelingt, die replikativen Strukturen von den nichtreplikativen abzutrennen (z.B. durch Nitrocellulosechromatographie (20)), werden solche Computermodelle experimentell nachprüfbar. Durch Anpassung von Erwartungswerten an experimentelle Daten durch Variation von Modellparametern (Replikongröße, Gabelgeschwindigkeit, Zeitgesetze von Initiation und Reifung) lassen sich diejenigen Werte der Parameter ermitteln, mit Hilfe derer das Modell die experimentellen Daten am besten zu erklären in der Lage ist. Sind diese Parameter noch auf andere Weise direkt meßbar (z.B. durch DNA-Faserautoradiographie), so läßt sich aus dem Grad der Übereinstimmung auf die Gültigkeit des mathematischen Modells schließen.

Eines der Hauptprobleme bei derartigen Untersuchungen ist die Erzeugung und genaue analytische Erfassung der DNA-Fragmente. In dieser Arbeit sollte eine möglichst gut abgesicherte Analyse von replikativen und nicht replikativen Fragmenten, die durch Kryolyse (21), einem stochastisch arbeitenden Fragmentierungsprozess, entstehen, durchgeführt werden. Zu ermitteln waren vor allem die Kettenlängen und die Kettenlängenverteilungen der Fragmente. Dabei kam der Elektronenmikroskopie als einer direkten Methode neben elektrophoretischen und Ultrazentrifugen-Verfahren eine zentrale Bedeutung zu (Abschnitt 3).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Ehrlich-Ascites-Tumorzellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen handelt es sich um einen sowohl in vivo als auch permanent in vitro züchtbaren Stamm (22,23). Die biologischen Eigenschaften der Zellen sind in (24) beschrieben. Ihre Haltung als Ascitestumor erfolgt auf weiblichen NMRI-HAN-Mäusen von 20 - 25 g (Züchtung: Zentralinstitut für Versuchstiere, Hannover). Zur Inokulation wurden 0,2 ml (ca. 25×10^6 Zellen) eines 7 Tage alten Ascites in die Bauchhöhle gesunder Mäuse überimpft. Für die Experimente wurde durchweg Zellmaterial verwendet, das 4 Tage nach der Inokulation entnommen wurde. Der Tag des Überimpfens zählt als nullter Tag. Zum Zeitpunkt der Entnahme befinden sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (24).

2.1.2. Escherichia coli ($\lambda\, c_I 857\, s_{am} 7\, p\, lac\, 5$)

Zur Eichung bei den Molekulargewichtsbestimmungen wurde die DNA des obengenannten λ-Phagens verwendet. Der Stamm wurde mir freundlicherweise von Prof. Dr. Zillig vom Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) überlassen. Dieser Stamm wurde erstmals in (25) beschrieben.

2.2. Entnahme der Ascites-Zellen

Zur Entnahme der Ascites-Zellen wurde die Maus durch Genickbruch getötet. Die Bauchhaut wurde vorsichtig aufgerissen, und nach Injektion von 1-2 ml Kulturmedium (37°C), das 5 USP-Einheiten Heparin (Liquemin^R, Roche) pro ml enthielt, wurde die Ascitesflüssigkeit mit einer Einmalspritze abgezogen. Zusammensetzung (26) und Herstellung des Mediums sind unter (24) beschrieben.

2.3. DNA-Markierungen

2.3.1. Langzeitmarkierung mit 14-C Thymidin

In frisch mit $HNO_3/H_2SO_4/SO_3$-behandelten Glasflaschen mit 37°C warmem Medium wurden Ascites-Zellen mit einem Titer von 400.000 Zellen/ml eingesät. Die Kultur wurde mit 0,05 µCi/ml ^{14}C Thymidin (2-^{14}C Thymidin, Nen Chemicals, spez. Aktivität 50 mCi/mM) versetzt und unter Lichtschutz wachsen gelassen. Nach ca. 16 h wurde die Kultur mit dem gleichen Volumen frischen, 37°C warmem Medium verdünnt und nochmals 0,037 µCi/ml für weitere 8 h zugesetzt. Die Zellen bauten in dieser Zeit ca. 6-8000 IPM/µg DNA ein.

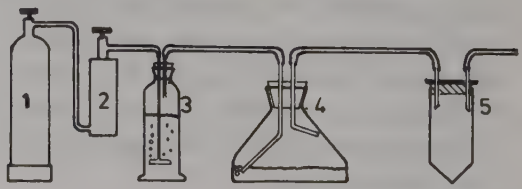
3.3.2. Puls- und Puls/Chase-Markierung mit ^{3}H Thymidin

Für Pulsmarkierungen bis 20 Min. Dauer wurden maximal 5 x 10^6 Zellen /ml in 37°C warmes Medium eingesät und mit der für jeden Versuch angegebenen Menge isotonem (0,9% NaCl) Methyl-^{3}H Thymidin (Nen Chemicals, spezifische Aktivität 50-60 Ci/mMol) versetzt. Bei Puls/Chase-Markierungen wurden die Zellen in das 5-fache Volumen Medium überführt, das 10^{-5}M nicht markiertes Thymidin (Serva) enthielt, und für die gewünschte Chase-Zeit weiterinkubiert. Der Einbau der Radioaktivität wurde durch Überführen des Inkubationsansatzes in eine Mischung aus Hanks-Lösung (22) und gefrorener Hankslösung gestoppt.

3.3.3. "Spezifische"Markierung der Initiationsregionen

In einen Weithalserlenmeyer-Kolben mit 200 ml Medium werden

Abb. 2.1



1 Edelgas
2 Katalysator
3 Waschflasche (0,9%NaCl)
4 Zellkultur
5 Zentrifugenglas

200 x 10^6 Zellen eingesät, und ca 1 h ins Medium O_2-freies, wasserdampfgesättigtes, steriles Argon eingeleitet (Argon 95%, CO_2 5%, Versuchsanordnung siehe Abb. 2.1). Danach wird der Gasstrom reduziert und das Edelgas für weitere 6 h nur noch über das Medium strömen lassen. Der Gasauslass führte über ein luftdicht verschlossenes Zentrifugenglas. Nach insgesamt 7 h wurde das Begasungsgefäß gekippt und das Medium mit dem Argonstrom in das Zentrifugenglas zur anaeroben Zentrifugation übergetrieben.
Die spezifische Aktivität der zugesetzten DNA-Vorstufen ist für jedes beschriebene Experiment angegeben (Methyl-3H Thymidin siehe 2.3.2). Erfolgte die Markierung unter anaeroben Bedingungen, so wurde der Pelletüberstand bis auf 30 ml mit Argon ausgetrieben, und die Radioaktivität wurde den wieder aufgewirbelten Zellen anaerob zugesetzt. Zur Puls-Markierung nach Aufhebung der Anaerobie wurde das Medium über den pelletierten Zellen abgegossen, sofort 30 ml aerobes Medium zugegeben und nach einer Wartezeit nicht über 10 Min. die Radioaktivität zugegeben. Bei Pulsmarkierungen mit noch längerer Wartezeit nach Anaerobie wurden die Zellen im Begasungsgefäß belassen, mit einer Membranpumpe für die Dauer der Aufhebung begast und aerob abzentrifugiert. Das Pellet wurde in konditioniertem Medium aufgewirbelt und die Radioaktivität zugegeben. Konditioniertes Medium ist der zellfreie Überstand einer 1 h alten Ascites-Kultur, die mit 2 x 10^6 Zellen/ml eingesät worden war. Der Einbau der Radioaktivität nach der gewünschten Pulszeit wurde nach 2.3.2 gestoppt.

2.3.4. Dichtemarkierung mit 5-Brom-desoxy-Uridin

Dichtemarkierung mit 5-Br-desoxy-Uridin (p.a. Serva, Heidelberg) wurde bei einer Konzentration von 10^{-5}M im Medium für die Dauer von 3 h durchgeführt.

2.4. Isolierung von Ascites-DNA

2.4.1. Puffer, Lösungen, Enzyme

Puffer A: 0,24 M Sucrose, 10 mM TRIS-HCl, 5 mM $MgCl_2$ pH 7,5

Puffer A 58: wie Puffer A, zusätzlich 0,5% Brij 58 (Serva)

Puffer S: 0,35 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, pH 7,5

2-M Citratpuffer: 50 mM Na_3-Citrat, 2M NaCl, 5 mM EDTA

Phenol pH 9: Frisch destilliertes Phenol wurde mit 1 mM EDTA-Lösung im Verhältnis 9:1 gemischt und mit 12 M KOH auf pH 9 eingestellt und eingefroren.

Puffer C: 50 mM TRIS-HCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaCl pH 8

Puffer 0,1 TBS bzw 0,4 TBS: 0,1 bzw 0,4 M NaCl, 50 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA pH 6,75

RNAase-Mischung: Pancreatische RNAase (EC 3.1.4.22 Serva, Heidelberg, 45 Kunitz-Einheiten, 1 mg/ml in H_2O dest.) wurde 3 mal 10 Min. lang auf 80°C erhitzt, auf Trokkeneis eingefroren und anschließend mit 10.000 Einheiten RNAase T1 aus Aspergillus oryzae (EC 3.1.4.8, Merck, Darmstadt) versetzt.

Proteinase K: (Merck, Darmstadt, 20 m Anson E/mg) Lösung von 1 mg/ml H_2O dest. wurde 1 h bei 37° C vorinkubiert.

Lysepuffer: 0,05 M TRIS-HCl, 0,1 M EDTA, 0,1 M NaCl, 1% Sarcosyl, pH 7,9

0,1 SSC: 15 mM NaCl, 1,5 mM Na_3 Citrat

2.4.2. Herstellung von Zellkernen (27)

2 mal in eiskalter Hanks-Lösung gewaschene Zellen (22) wurden nochmals in Puffer A gewaschen. 200 x 10^6 Zellen wurden in 250 ml Puffer A 58 bei 4°C 10 Min quellen lassen und dann 3 mal je 20 s mit einem Ultraturrax (T 45 mit Arbeitskopf TP 456, Jahnke & Kunkel) homogenisiert. Die Kernsuspension wurde zentrifugiert und das Kernpellet vorsichtig mit einer weitlumigen Pipette in Puffer S suspendiert.

2.4.3. Standard-DNA-Aufarbeitung

In Puffer S gewaschene Zellkerne von ca. 2 x 10^8 Zellen wurden in 8 ml 2 M Citratpuffer suspendiert, mit 4 ml Phenol pH 9 vermischt und 1 h mit ca 50 UPM mit einem Rührmotor gedreht. Die Phasentrennung erfolgte 10 Min. bei 8000 g. Die wässrige Phase wurde mit einer weitlumigen Pipette abgenommen, die Interphase zurückgelassen und gegen Puffer C dialysiert. Die hochviskose DNA wurde mit 50 µl RNAase-Mischung pro ml versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von SDS (10-prozentige wässrige Lösung) ad 0,5% und 0,1 ml Proteinase-K-Lösung pro ml wurden weitere 12 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde NaCl ad 0,4 M zugegeben und 1 h mit Phenol pH 9 wie oben gedreht.

2.4.4. DNA-Reinigung über präparative CsCl-Gradienten (28)

Diese Aufarbeitung wurde alternativ zu 2.4.3 durchgeführt. In Puffer S gewaschene Kerne von ca 2 x 10^8 Zellen (2.4.2.) wurden in 5,5 ml Lysepuffer, der zusätzlich 150 µg/ml Proteinase K enthielt, suspendiert, ohne weitere mechanische Agitation in ein Polyallomerröhrchen passend zum Beckmann Rotor 60 Ti überführt, mit einem Stopfen verschlossen und 18 h bei 37°C inkubiert. Bei einem Gewichtsanteil der leeren Röhrchen von 3,77 g wurde mit gesättigter CsCl-Lösung in 0,1 SSC auf 33 g aufgefüllt, die Zentrifugenröhrchen verschlossen und 20 h bei 20°C und 41 000 UPM im 60 Ti Rotor zentrifugiert. Durch Anstechen der Röhrchen wurde die Unterphase ausgetropft, die Oberphase abgehebert, und die viskose DNA-Bande in ein weiteres, zum selben Rotor passendes Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurde wie oben mit CsCl-Lösung einer Dichte von 1,7 g/ml auf 33 g aufgefüllt und unter denselben Bedingungen rezentrifugiert. Danach wurde die DNA gegen 0,1 TBS und 0,4 TBS-Puffer dialysiert, in N_2 fl. gefroren, gemörsert und nach 2.4.5. weiterbehandelt.

2.4.5. Entproteinisierung bei hoher Ionenstärke

Den DNA-Lösungen von den Schritten 2.4.3. und 2.4.4 wurden fester Harnstoff und NaCl bis zu einer Endkonzentration von 5M bzw. 3M zugesetzt und nochmals mit 1/2 Vol. Phenol pH9 30 Min. wie oben gedreht, die Phasen getrennt (Phasenumkehr) und die wässrige Phase gegen einen adäquaten Puffer dialysiert.

2.5. Isolierung von λ p lac 5 - DNA

2.5.1. Medium und Agarplatten

Ein Liter Vollmedium enthielt: Pepton 10g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 5 g, TRIS 12 g, HCl conc. p.a. 7,5 ml. Die Substanzen wurden in Leitungswasser gelöst.
Für die Herstellung von Agarplatten wurden 100 ml Vollmedium vor dem Autoklavieren 1 g Agar zugesetzt und danach bei ca. 60° C mit einem 15 ml-Papagei in Petrischalen gegossen.

2.5.2. Lagerung der Bakterien

Bakterien der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden in sterilen Injektionsflaschen mit einem Zusatz von 30% Glycerin schnell bei -30°C eingefroren und waren so jahrelang haltbar.

2.5.3. Gewinnung der Phagen und Isolierung der DNA

a) Großpräparation
Aus einer bei 25°C gewachsenen Übernachtkultur werden soviel Bakterien in die Hauptkultur überimpft (4 l, 30°C), daß eine durch Streulichtmessung bei 548 nm ermittelte optische Dichte (LW ist steriles Medium) von 0.01 resultiert. Die Hauptkultur wird geschüttelt und belüftet. Bei Erreichen einer O.D. von .25 muß die Kultur schnell für 6 Min. auf 42°C aufgeheizt werden und danach weitere 3 h bei 37°C zur Phagenproduktion belassen werden. Die Bakterien wurden in einem

Durchflußrotor (Christ-Zentrifuge) bei 7000 g pelletiert und in 20 ml Lysepuffer (10 mM TRIS-HCl, 2 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 70 mM NaCl pH 7,3) suspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Chloroform werden die Bakterien unter kräftigem Schütteln lysiert und die ausgetretene Bakterien-DNA mit insgesamt 2,5 /ug DNAase I 10 Min. bei 37°C verdaut. Zur Phasentrennung wurde 10 Min. bei 8000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde auf einen CsCl-Stufengradienten (Dichten: 1,74; 1,55; 1,46; 1,29 g/ml, je 5 ml) in einem zum Rotor SW 27 passenden Nitrocelluloseröhrchen überschichtet. Die Gradienten wurden 2 h bei 15°C und 22 000 UPM im Rotor SW 27 zentrifugiert. Die Phagen saßen als opaleszierende Bande der Dichtestufe 1,55 g/ml auf und wurden in einem Rotor 50 Ti nochmals 36 h bei 20°C in CsCl mit einer Ausgangsdichte von 1,478 g/ml rezentrifugiert. Die Phagen konnten in CsCl längere Zeit bei 4°C gelagert werden.

b) 150 ml Kultur

Kleine Mengen Bakterien wurden mit 2,5 ml Lysepuffer versetzt, nach Lyse und Phasentrennung davon 2,4 ml zu 1,88 g festem CsCl in ein SW 50 Zentrifugenröhrchen gegeben und im Rotor SW 50 18 h bei 27 000 UPM und 20°C zentrifugiert.

c) Isolierung der λ-DNA

Die phagenhaltige CsCl-Lösung wurde, um osmotischen Schock der Phagen zu vermeiden, zunächst mit CsCl-Lösung (1,5 g/ml) auf eine O.D. 260 nm von 25.0 verdünnt und dann gegen 0,1M NaCl, 0,1 M PO_4-Puffer pH 7,1 dialysiert. Die dialysierten Phagen wurden mit 1/20 Vol 10% SDS und 1 Vol puffergesättigtem Phenol (pH 8) versetzt und 30 Min. bei 50 UPM mit einem Motor gedreht. Nach Phasentrennung wurde die DNA zuerst gegen 20 mM EDTA pH8 dialysiert und dann gegen 10 mM TRIS, 1 mM EDTA.

2.5.4. Herstellung 14-C markierter λ-DNA

λ-Phagen-DNA mit einer spezifischen Aktivität von ca. 300 IPM/ug DNA wurde erhalten durch Zugabe von 0,01 uCi/ml 14-C Thymidin (2-14C Thymidin, spezifische Aktivität 50 mCi/mMol, Nen Chemicals) 5 Min. nach Beendigung des Hitzeschrittes. 0,1 uCi/ml ergaben eine Aktivität von 2200 IPM/ug DNA.

2.6. Andere Nucleinsäuren

Die gereinigte Phagen-DNA der T5-Mutante st(o) (29) wurde mir freundlicherweise von V. Gekeler zur Verfügung gestellt. Endo Eco R I -Restriktionsfragmente von λ-Wildtyp-DNA wurden bezogen von Boehringer, Mannheim.

2.7. Isopyknische Zentrifugation

2.7.1. Ag^+/ Cs_2SO_4 Satellitabtrennung(30)

Gereinigte und mehrere Tage chloridfrei gegen 10 mM Boratpuffer pH 9,2 (in bidest. H_2O) dialysierte Ascites-DNA wurde bis zu einem Probenvolumen von 7 g in ein Polyallomer-Zentrifugenröhrchen passend zum Rotor 50 Ti gefüllt. Ein Gradient enthielt zwischen 100 und 400 µg DNA. Dieser DNA-Lösung wurden pro 50 µg DNA 20 µl einer 2 mM Silberperchloratlösung zugesetzt. Die Silberperchloratlösung wurde immer frisch aus einer Stammlösung (20 mM) hergestellt und vor Lichteinwirkung geschützt. Da $AgClO_4$ hygroskopisch und eine genaue Einwaage nicht möglich ist, wurde die Molarität gravimetrisch durch Silberabscheidung an einer Platinelektrode in schwefelsaurer Lösung bei 80°C und 1,3 V bestimmt. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit Boratpuffer (10 mM, pH 9,2) auf 7,5 g aufgefüllt und mit 5,17 g festem Cs_2SO_4 versetzt. Nach vorsichtigem Umschütteln ergab sich ein Brechungsindex von $n_D^{25} = 1{,}374$ ($\rho = 1{,}501$ g/ml). Die Zentrifugenröhrchen wurden verschlossen, mit Paraffin aufgefüllt und 72 h bei 25°C und 45.000 UPM im Rotor 50 Ti zentrifugiert. Die Zentrifuge wurde nicht abgebremst und die Gradienten in Fraktionen zu 250 µl gesammelt. Der Brechungsindex jeder 5-ten Fraktion wurde am Abbée-Refraktometer gemessen und die zugehörigen Dichten nach einer linearen Beziehung (31) errechnet.
Die Bestimmung der Radioaktivität in einzelnen Fraktionen des Gradienten erfolgte nach 2.12.4. Die vereinigten Haupt- und Satellitenbanden wurden zur Silberentfernung ausgiebig gegen 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM PO_4-Puffer pH 7 dialysiert.

2.7.2 Isopyknische Auftrennung dichtemarkierter DNA

Brom-desoxy-Uridin markierte DNA in SSC-Puffer wurde bei einer Ausgangsdichte von 1,731 g/ml in einem Volumen von 8,1 ml 76 h bei 25°C im Rotor 50 Ti zentrifugiert. Der Gradient wurde von unten her angestochen und 14 Fraktionen zu jeweils 600 µl gesammelt.

2.8. Fragmentierung von Ascites-DNA

2.8.1. Ultraschallbehandlung

Die Beschallung von ca. 10 ml DNA-Lösung in 0,4 M NaCl, 50 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA pH 6,75 erfolgte in speziellen Glasgefäßen, die eine gerichtete Umwälzung und effektive Kühlung gewährleisteten. Vor der Beschallung wurde Stickstoff in die Lösung eingeleitet. Die Beschallung wurde bei einem Strom von 1,5 A mit einem Branson-Sonifier (Branson Instruments Inc., Danburg, Connecticut, USA) 12 mal 10 Sekunden lang mit dazwischenliegenden Kühlperioden von 40 Sekunden durchgeführt.
Die erhaltenen Fragmentlängen waren ca. 500 - 700 Basenpaare.

2.8.2. Hydrodynamischer Scher

DNA-Lösungen unterschiedlicher Konzentration wurden bei neutralem pH im Eisbad mindestens 10 mal mit einer 2 ml Record-Spritze innerhalb von jeweils 4 s von Hand durch eine enge Kanüle gepresst (Typ 27 G x 5/8, Größe 0,4 x 16 mm).

2.8.3. Kryolyse nach Lyskov und Moshkovsky (21)

Proteinfreie, hochmolekulare DNA mit einer Konzentration von 60 - 100 µg/ml in 0,4 M NaCl, 50 mM TRIS-HCl, 1mM EDTA pH 6,75 wurde in vergoldete Messingkammern gefüllt, die mit gefetteten Styroporddichtungen und 1 mm Abstandhaltern verschlossen wurden. Jeweils eine von mehreren Kammern enthielt einen Ther-

mofühler, der mit einem Linseis-Schreiber verbunden war. Die gefüllten Kammern wurden in einen halbautomatischen Apparat eingespannt, der die Kryolysekammern in einem programmierbaren Rhythmus in ein Thermosgefäß mit flüssigem Stickstoff so lange eintauchte, bis die DNA-Lösung -190°C erreicht hatte, und danach in ein Wasserbad mit 30°C, bis die DNA-Probe vollständig aufgetaut war. Die Gefrier- und Auftauzeiten betrugen ca. 1,5 und 1,8 Min. Es wurden jeweils ca. 120 Kryolysezyklen durchgeführt. Nach 40 und 80 Kryolysezyklen wurden die Kammern mit einem eingeschlossenen vergoldeten Eisendraht mittels eines Magneten durchmischt.

2.9. Verdauung von Phagen-DNA mit Endo Eco R I

Zur Verdauung mit Restrictionsendonuclease Endo Eco R I (10.000 E/ml, Boehringer, Mannheim) wurde die DNA in 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA pH 8 mit demselben Puffer auf eine Konzentration von 150 µg DNA/ml verdünnt. Der 5-fach Verdauungspuffer enthielt 0,5 M TRIS-HCl, 0,25 M NaCl und 50 mM $MgCl_2$ pH 7,5. Das Enzym wurde unmittelbar vor Inkubation mit Enzym-Verdünnungspuffer (10 mM K-PO_4, 0,2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,7 mM Mercaptoäthanol, 2 mg/ ml Rinderserumalbumin, 0,2% Triton (v/v) pH 7) 1: 5 verdünnt.
Der Inkubationsansatz enthielt 7 Vol. DNA-Lösung, 2 Vol. 5-fach Puffer und wurde mit einem Vol. verdünntem Enzym bei 37°C gestartet. Die Reaktion wurde nach 60 Min. durch Zugabe von 0,4 Vol. 0,5 M EDTA gestoppt.

2.10. Nitrocellulose-Chromatographie (32)

Die NC-Chromatographie ist unter (32) ausführlich beschrieben. Die Elution der bindenden DNA wurde von dieser Referenz abweichend in 2 Stufen mit zunächst 0,5% SDS in 10 mM EDTA pH 7 und dann mit H_2O durchgeführt, das Säulenmaterial ausgepresst und der irreversibel bindende DNA-Anteil nach 2.12.6 bestimmt.

2.11. Hydroxylapatit-Chromatographie (33)

2.11.1. Puffer, Säulenmaterial, cot-Werte

0,5 M Stammlösungen von Na_2HPO_4 wurden im selben Verhältnis verdünnt, und Puffer (PB) beliebiger Molarität durch Titration der alkalischen Komponente mit der sauren Komponente auf pH 7 eingestellt.
Die Bestimmung der Phosphatkonzentration in den Gradientenfraktionen erfolgte nach Chen et al.(34).
Zur Hydratisierung und Äquilibrierung des trockenen Hydroxylapatit (HAP) (Bio-Gel HTP, DNA Grade, Bio Rad) wurden Aliquots 15 Min. in 0,1 M PB gekocht, gevortext und kurz zentrifugiert. Mikrokristalle im Überstand wurden durch Absaugen des Puffers entfernt. Die theoretische Kapazität des HAP von 200 ug/ml wurde nur zu 10 - 20% ausgenützt.
Um Verluste von DNA durch unspezifische Adsorption an Gefäße gering zu halten, wurde in Edelstahl-Zentrifugenröhrchen de- und renaturiert.
Es wurden 8 Vol. DNA in 0,025 M PB , 0,1 mM EDTA pH 7 mit 1 Vol. 0,5 M NaOH versetzt und 10 Min. bei 60°C denaturiert. Die Renaturierung wurde durch Neutralisierung mit 1 Vol 1 M $Na\ H_2PO_4$ eingeleitet (35). Renaturierung erfolgte bei 60°C in 0,12 M PB für 36 Sek. bei einer DNA-Konzentration von 1 ug pro ml (cot = 10^{-4} Mols/l).
Die zu vorgegebenen cot-Werten gehörenden Renaturierungszeiten wurden nach folgender Beziehung errechnet:

$$cot = \frac{E_{260}}{2} \cdot t \cdot S \quad (t \text{ in Stunden})$$

Die Extinktion der DNA-Probe wurde in 0,18 M PB gemessen.
Der Salzfaktor S, der für 0,12 M PB gleich 1 ist, wurde für andere Ionenstärken nach (33) umgerechnet.

2.11.2. HAP-Säulenchromatographie mit kontinuierlichen Gradienten

Als Säulen wurden 5 ml Recordspritzen verwendet, deren Auslauf mit Cellulosefilterplättchen versehen war. Die Renaturierung der DNA bei 60°C wurde durch Zugabe von 3 Vol. eiskaltem H_2O gestoppt und sofort mit einer Schlauchpumpe auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0,05 M PB - 0,5 M PB bei Raumtemperatur. Die Pumpgeschwindigkeit für Auftrags- und Elutionspuffer betrug bei einer 1 ml-Säule 0,2 ml/Min, das Gradientenvolumen 20 ml.

2.11.3. HAP-Zentrifugationstechnik

Bei dieser Technik wurde der HAP zur Adsorption der DNA und stufenweisen Elution jeweils 3 s durch Vortexen durchmischt, und weitere 7 s in einer speziellen Tischzentrifuge mit hoher Leistungsaufnahme und ca. 1 s Beschleunigungszeit bei 1240 g sedimentiert. Die Überstände wurden mit einer Wasserstrahlpumpe über einen Adapter innerhalb von 2 s in vorbereitete Reagenzgläser gesaugt. Alle Schritte außer der kurzen Zentrifugation wurden bei 60° bzw bei 70°C durchgeführt. Die Chromatographie erfolgte in 4 Schritten.

1) Nach Ablauf der Renaturierungszeit bei 60°C wurde die Probe (üblicherweise 5 ml) zu 500 mg feuchtem HAP (Einwaage 150 mg trockener HAP) gegeben, gevortext, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

2) Das Sediment wurde sofort mit 5 ml 0,12 M PB 60°C vermischt, 5 Min. im Wasserbad äquilibriert, danach erneut gevortext, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und ins Eisbad verbracht.

3) Das Sediment wurde mit 5 ml 160 mM PB vermischt, 10 Min. im Wasserbad bei 70°C äquilibriert und wie oben eluiert.

4) Das Sediment wurde nochmals bei 70°C mit 0,45 M PB eluiert.

Den Elutionsvolumina wurde 1/10 Vol. entnommen, das Säulenmaterial selbst zur Bestimmung der irreversiblen Bindung aufgelöst, wie unter 2.12.5. beschrieben, und die Radioaktivität ge-

messen. Zur Rechromatographie des bindenden 450 mM PB-Eluates wurde 1: 18 verdünnt (Endkonzentration 25 mM PB), mit 0,5 /ug/ml Kalbsthymus-Carrier-DNA versetzt und erneut im vergrösserten Volumen denaturiert und wie oben im batch-Verfahren mit 2 ml HAP chromatographiert. Das vergrößerte Volumen (80 ml) mußte nach Renaturierung in einer Stockzentrifuge länger zentrifugiert werden. Dadurch erhöhte sich der cot Wert auf ca. 10^{-3} Mols/l am Ende des Gesamtvorganges.

2.11.4. HAP-Säulenchromatographie mit Stufengradienten

Bei dieser präparativen Technik wurden renaturierte DNA-Lösung und HAP bei 60°C durchmischt und schnell in eine thermostatisierte Glassäule gefüllt. Säulenpackung und Entfernung des Puffers mit noch nicht renaturierter DNA erfolgte in einem Schritt durch manuelles Saugen mit einer 20 ml Record-Spritze am Säulenauslauf mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von ca. 2 ml pro s. So konnte ein cot-Wert von 5×10^{-4} Mols/l erzielt werden. Die Elution erfolgte bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/Min. mit PB in drei Stufen: 120 mM PB 60°C, 10 Säulenvolumen, 160 mM PB 70°C, 2 Säulenvolumen, und 450 mM PB 70°C, 2 Säulenvolumen. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt, und die 2 Fraktionen des 450 mM PB-Eluates, die am meisten fold back DNA enthielten, wurden vereinigt und zur Präparation für die Elektronenmikroskopie umdialysiert.

2.12. Radioaktivitätsbestimmungen

2.12.1. Szintillatoren, Lösungsvermittler, Filter

Toluol-Szintillator: 5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,2 g 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazol)-Benzol (POPOP) wurden in 1 l getrocknetem frisch destilliertem Toluol gelöst und lichtgeschützt aufbewahrt.

Triton-Szintillator: Triton-X-100 und Toluol-Szintillator 3:7, Ready-Solv HP^{R}, Gradient-Solv^{R}, Filter-Solv^{R} (Beckmann Instruments); Instagel^{R}, Hyamine^{R} (Packard Instruments).

Membranfilter (Schleicher & Schüll, Typ BA 90, Porengröße 0,6 µm)
Glasfaserfilter (Whatmann GF/C)

2.12.2. Säurefällbare Radioaktivität in DNA-Lösungen

Wässrige DNA-Proben wurden mit 20 µg/ml Carrier-DNA versetzt (Kalbsthymus-DNA in SSC) und im Eisbad 30 Min. mit so viel 15%-iger TCA gefällt, daß ein 5%-iger Säureüberschuß vorhanden war. Die Präzipitate wurden auf Membranfiltern gesammelt, mit 1%-iger TCA gewaschen und nach dem Trocknen der Filter bei 80°C die Radioaktivität in 5 ml Toluolszintillator im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

2.12.3. Eingebaute Radioaktivität aus ganzen Zellen

a) 1 ml Medium mit bis zu 1 x 10^6 Zellen wurde 2 mal mit 9 ml eiskalter Hanks-Lösung (22) gewaschen, das Pellet gut suspendiert und 30 Min. mit 5 ml 5% TCA im Eisbad extrahiert und erneut pelletiert. Die suspendierten Zellen wurden 15 Min. mit 1,5 ml 0,2 M NaOH bei 0°C lysiert, mit 1,5 ml 15% iger TCA 30 Min. gefällt und auf Glasfaserfiltern gesammelt. Die Filter wurden mit 0,5 ml Hyamine^R 15 h bei 37°C inkubiert, mit 10 ml Toluolszintillator versetzt und die Radioaktivität nach Abklingen der Chemolumineszenz (5 h) gemessen. Die Bestimmung der Zählausbeute und der Kreuzkontamination erfolgte durch Zugabe von 14-C Toluol und 3-H Toluol als innerem Standard.
b) Der Verbrauch von Radioaktivität im Medium wurde direkt durch Messung von 0,1 ml des ersten Waschüberstandes (Hankslösung) in 5 ml Ready-Solv HP^R ermittelt.

2.12.4. Probenbehandlung für spezielle Zählprobleme

Proben aus Fraktionen von Schwersalzgradienten:
Papierfilter wurden mit 15% TCA in Äther getränkt, getrocknet und mit einem harten Bleistift gekennzeichnet. Auf jedes Fil-

ter wurden bis zu 40/ul CsCl oder Cs_2SO_4-Gradientenmaterial pipettiert. Die getrockneten Filter wurden auf einem Sieb (Glas) nacheinander in 5% TCA, EtOH und Äther gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität in Toluolszintillator gemessen.

b) Radioaktivitätsbestimmung aus Fraktionen der HAP-Chromatographie

Fraktionen unterschiedlicher PB-Molarität wurden auf 60 mM PB verdünnt, mit 0,1 mg Carrier-DNA versetzt, mit einem Überschuß von 5% TCA 30 Min. im Eisbad gefällt, die DNA auf Glasfaserfiltern gesammelt und wie unter 2.12.3. weiterbehandelt. Zur Bestimmung der irreversiblen Bindung wurde 1 ml feuchter HAP mit 0,1 mg Carrier-DNA gevortext, in 4 ml eiskalter 50%-iger TCA gelöst, die DNA 30 Min. gefällt und wie oben weiterbehandelt.

c) Bestimmung der irreversibel an Nitrocellulose bindenden DNA-Radioaktivität

Mit H_2O eluierte Nitrocellulosesäulen wurden ausgepresst, zerkleinert, ca. 1 g feuchte Nitrocellulose bei Raumtemperatur über Nacht in 20 ml Filter-Solv aufgelöst und die Radioaktivität der klaren homogenen Lösung gemessen.

d) Radioaktivitätsbestimmung in Agarosegelstreifen

Agarose-Gelstreifen bis zu 0,2 g wurden mit 0,5 ml 1N HCl versetzt, 2 h bei 80°C in verschlossenen Szintillationsgläschen verflüssigt, mit 5 ml Ready-Solv HP oder Triton-Szintillator gemischt und gemessen.

2.13. Zonensedimentation im Rohrzuckergradienten

Die Zentrifugationen wurden in den Rotoren SW 40 Ti und SW 27 in einer Spinco-Ultrazentrifuge L2-65 B oder L5-75 durchgeführt. Die Zentrifugationsbedingungen für die verschiedenen Rotoren waren:

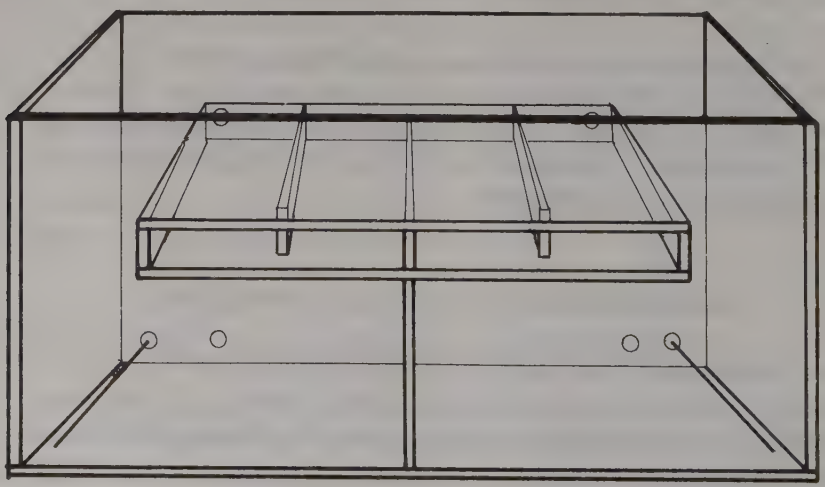
SW 40 Ti:
5-30% linearer Sucrosegradient, 0,2 M NaCl, 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA pH 7,8; alkalische Gradienten enthielten zusätzlich 0,12 N NaOH; vorgelegtes Sucrosekissen: 0,5 ml 30% ige Sucrose; Gradientenvolumen 12 ml; Auftragsvolumen 0,5 ml; 39 000 UPM, 5°C.
SW 27:
15-30% linearer Sucrosegradient, 0,6 M NaCl, 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, 0,1% Sarcosyl, (w/v), pH 7,8; alkalische Gradienten (36) enthielten zusätzlich 0,25 M NaOH; vorgelegtes Sucrosekissen: 1 ml; Gradientenvolumen 36 ml; Auftragsvolumen 1 ml; 23°C, 26 000 UPM.
Zur Eichung wurden DNA-Fragmente bekannten Molekulargewichtes verwendet, deren $s_{20,w}$-Werte nach Studier (37) errechnet wurden.

2.14. Agarosegel-Flachbett-Elektrophorese (38,39)

2.14.1. Elektrophorese-Geräte

Zur Agarosegel-Elektrophorese von Nucleinsäuren wurden zwei selbst konstruierte Elektrophoresegeräte verwendet.

Abb. 2.2 Elektrophoresekammer aus Glas



Modell 1 (Abb 2.2) wurde aus Fensterglaszuschnitten von 4 mm Stärke mit Silikonkautschukkleber (Elastosil E 41, Wacker) haltbar geklebt. Die 6 Durchführungen durch die Rückwand, für Strom-, Kühlwasserversorgung und zur Pufferumwälzung wurden mit einem 4 Ø mm Diamantbohrer auf einer Weich-PVC-Unterlage bei niedriger Drehzahl und einem geringen Andruck am Bohrstand unter Wasserkühlung gebohrt.

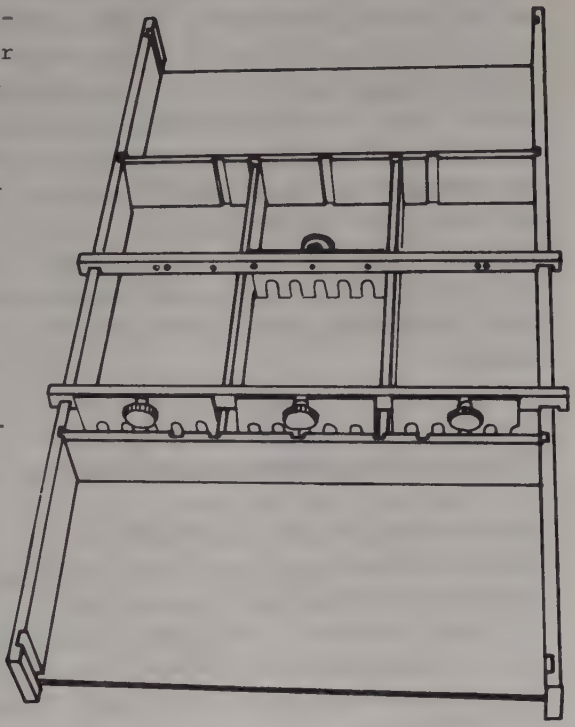
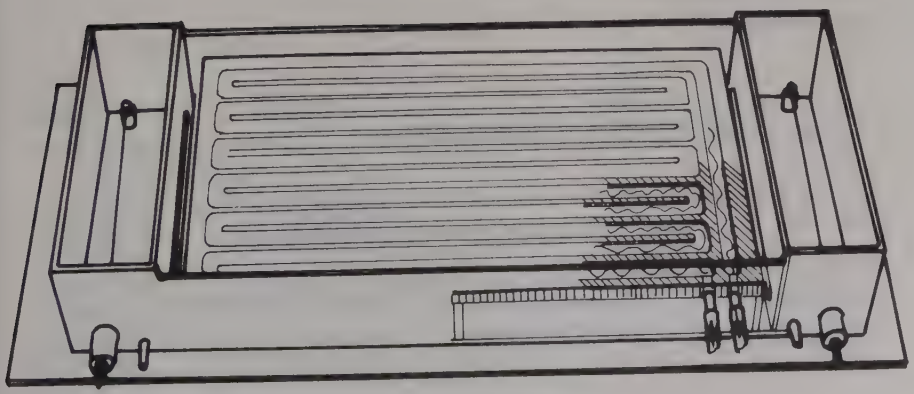


Abb. 2.3
Elektrophoresekammer aus Plexiglas und UV-transparenter verstellbarer Gelschlitten.



Modell 2 (Abb. 2.3) wurde aus Plexiglas gefertigt, verschraubt und mit in Dichloräthylen gelöstem Plexiglas geklebt. Zur Elektrophoresekammer wurde ein 50 cm langer Schlitten gefertigt, der mit Plexiglasstegen in bis zu 4 Kammern mit 3 verschiedenen Längen unterteilbar war. So konnten auf demselben Schlitten gleichzeitig 4 Gele unterschiedlicher Konzentration gegossen werden. Die frei verschieblichen Kammhalter erlaubten das Eingießen mehrerer Auftragsschlitzreihen auf langen Gelen. Die Auftragsschlitze konnten durch Zusammenklemmen zweier Kämme auf 3 mm verbreitert oder durch Umdrehen der Kämme auf 30 mm verlängert werden. Für den Schlittenboden wurde ein UV-transparentes Plexiglas (nicht im Handel, Geschenk der Firma Röhm & Haas, Typ 218) verwendet, auf dem die Agarosegele gegossen, elektrophoretisiert und direkt mit einem Transilluminator beleuchtet und fotografiert werden konnten.

2.14.2. Puffer, Lösungen, Materialien

Elektrophoresepuffer: 40 mM TRIS-Ac, 1 mM EDTA pH 7,7
Probenverdünnungspuffer: 20 mM EDTA pH 7,5
Agarosesuspension für Probenauftrag: 0,2% Agarose, 20 mM EDTA, 10 mM TRIS-HCl, 20% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau pH 7,8. Agarose durch Kochen lösen, bei 4°C erstarren lassen, mehrmals durch eine Kanüle scheren (Typ 12), bei 4°C lagern.
Agarose ME (SeaKem)
Ethidiumbromid (Serva,Heidelberg)

2.14.3. Durchführung der Elektrophorese

In 5 l Elektrophoresepuffer wurden 5 mg Ethidiumbromid gelöst und eine dem Gelvolumen entsprechende Menge Puffer entnommen. Die Geldicke betrug generell 4 mm. Die Agarose wurde im Gelpuffer kalt suspendiert, 10 Min. im siedenden Wasserbad gelöst und auf 60°C abgekühlt. Die Gele wurden im Kühlraum entweder in Kammern des Plexiglasschlittens oder auf

eine Glasplatte gegossen, deren Ränder 5 mm überstehend mit Tesaband umklebt waren. Die Kämme ragten ca. 3 mm in das Gel hinein. Die Gele wurden in die Elektrophoreseapparatur verbracht, ca. 1 mm mit Puffer überschichtet, eine Wasserumlaufkühlung mit 16°C angeschlossen, der Puffer zwischen beiden Vorratskammern umgewälzt (8 ml/Min) und eine Spannung von 2 V/cm angelegt. Nach ca. 30 Min. wurden die mit 1/5 Vol. Agarosesuspension beschwerten Proben durch den überstehenden Puffer in die Auftragsschlitze pipettiert.
Proben mit λ-DNA oder mit Restriktionsfragmenten von λ-DNA wurden 10 Min. auf 65°C zur Trennung der kohäsiven Enden erhitzt, schnell abgekühlt und aufgetragen. 0,1 µg DNA pro Bande war gut sichtbar, mehr als 1 µg führte zu Laufanomalien. Die Proben wurden zunächst 15 Min. bei 2 V/cm im Auftragsschlitz konzentriert, und dann bei 0,5 bis 0,7 V/cm mindestens 20 h elektrophoretisiert.
Zur Auswertung wurden die Gele mit einem Transilluminator (Ultra-Violet-Products Inc. California) bei der Anregungswellenlänge von 302 nm für DNA-Ethidiumbromidkomplexe durchleuchtet und die Fluoreszenz (598 nm) durch ein Rotfilter fotografiert (Ilford HP 5). Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung wurden einzelne Gelbahnen gekühlt, mit einem Rasierklingenhalter in 2 mm breite Streifen geschnitten und wie unter 2.12.4.d beschrieben gemessen.

2.15. Elektronenmikroskopische Methoden (41-44)

2.15.1. Materialien

Kupfergrids, 200 mesh, (125, 85, 40 µm) (Veco, Solingen)
Palladium-Draht 80:20, Legierung 1003 (Usine Genevoise de Dégrossisage d'Or, Genf)
Parlodion (Mallinkrodt, USA)
Cytochrom c, Herz Typ 6 (Sigma, München)
Uranylacetat, Formamid, Formaldehyd (Merck); N-Pentylacetat p.a. (Fluka)
weiteres EM-Zubehör wurde bezogen bei Agar Aids (Plano GmbH)

Fotomaterial:
Negativfilme: für das EM 9 Agfa Scienta, 7x7; für EM 109 Rollfilm Agfo Ortho 25.
Positivpapier: Agfa P 90; Ilford 5.1. M Glossy
Entwickler: Ilford Perceptol

2.15.2. Lösungen

Alle für die Elektronenmikroskopie verwendeten Chemikalien und Lösungen müssen größtmögliche Reinheit aufweisen, insbesondere frei sein von Fett und Detergentien. P. a. -Substanzen wurden nach (40) nachgereinigt. Puffersubstanzen wurden in H_2O bidest. gelöst und ebenso wie äthanolische Lösungen durch Membranfilter zentrifugiert (Filter für wässrire Lösungen: gemischter Celluloseester 0,22 µm Porengröße, Typ GSTF; Filter für äthanolische Lösungen: Cellulose-Triacetat, 0,2 µm Porengröße, Typ EGWP; beide Milipore). Dazu wurde eigens ein Filterhalter aus Plexiglas konstruiert, bei dem nur 5 µl des Probenvolumens durch Filterbenetzung verloren gehen (Abb. 2.4)

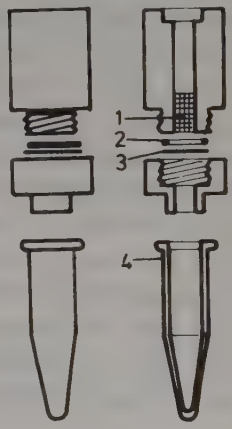


Abb. 2.4. Filterhalter für Probenvolumen bis 600 µl. 1= Probenvolumen, 2= O-Ring, 3= Membranfilter, 4= Eppendorfgefäß. Filtration erfolgte in einer Stock-Zentrifuge mit passendem Adapter.

a) Lösungen für Spreitungen (2.15.5.1)
Hypophase: 10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8,5
Formamid: Reinigung nach (40)
Salz-Lösung: 1M TRIS, 0,1 M EDTA pH 8,5
Cytochrom c: 1 mg/ml in 0,1 M TRIS, 10 mM EDTA pH 8,5

b) Lösungen für Isodenaturierungsmethoden (2.15.5.2)
Hypophase: 30 mM TRIS, 3 mM EDTA, pH 8,5, 25% Formamid, nicht länger als 5 Min. gebrauchsfähig.
Sofern nicht ausdrücklich vermerkt entsprachen die anderen Lö-

sungen denen, die für Spreitungen verwendet wurden.

c) Lösungen für die Diffusionsmethode (2.15.5.3)
Salz-Lösung: 2,4 M NH_4Ac pH 7
Formaldehyd: 8% in H_2O
Cytochrom c: 40 µg/ ml in 0,6 M NH_4Ac pH 7

d) Uranylacetatlösung:
Uranylacetat 50 mM, HCl 50 mM in 90% Äthanol wurden 2 Tage bei Raumtemperatur in einem lichtundurchlässigen Gefäß gerührt und filtriert.

2.15.3. Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Kleinste Probenvolumen (10-200 µl), die gegen einen isoosmotischen Puffer umdialysiert werden mußten, wurden auf schwimmende Membranfilter (gemischter Celluloseester, Porengröße 0,025 µm Typ VSWP, Milipore) in einer feuchten Kammer pipettiert und 2 h dialysiert (45). Für Probenvolumen zwischen 50 und 1000 µl wurden Dialysekammern aus Plexiglas konstruiert mit einem Gestell für 5 Dialysekammern (Abb. 2.5).

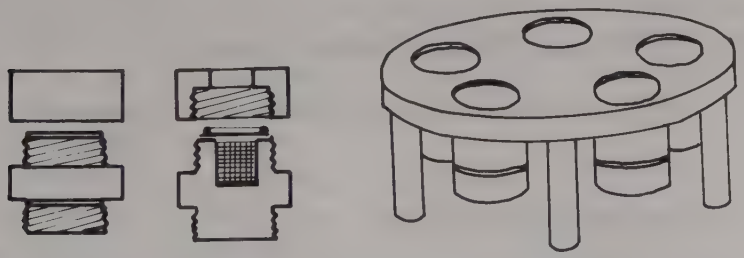


Abb. 2.5 Dialysekammer, und Halter für 5 Dialysekammern. Verschlußprinzip wie bei Abb. 2.4

Zur Entfernung von SDS aus DNA-Proben siehe Ref. (40).
Entfernung von Nitrocellulosepartikeln:
Nitrocellulosepartikel wurden immer in Gegenwart von SDS abgetrennt, da sonst einsträngige DNA mit den Partikeln verloren geht. Durch Phenolisierung der bindenden Fraktion der

Nitrocellulosechromatographie wurden gleichzeitig Protein und Nitrocellulosepartikel nach 20 Min. Zentrifugation bei 10.000 g in der Interphase angereichert.

Nitrocellulosepartikel wurden auch durch Zentrifugation in der Airfuge (Beckmann) abgetrennt. Bei einem Gasdruck von 30 PSI wurde 18 Min. zentrifugiert. Dabei wurden Moleküle und Partikel über 36 s ($36{,}8 \times 10^6$ D, k-Faktor des Rotors 11) pelletiert. Diese Methode führte unter diesen Bedingungen zu einem selektiven Verlust großer Moleküle.
Grobe partikuläre Verunreinigungen wurden ausserdem durch Zentrifugation durch Cellulosetriacetatfilter abgetrennt (2.15.2). DNA besitzt nach (33) keine Affinität zu diesen Filtern.

Die Aufbewahrung von Nucleinsäuren, die im Elektronenmikroskop dargestellt werden sollten, erfolgte in dichtschließenden Schraubgläsern über Chloroform. Langsames Einfrieren von Lösungen mit teilweise einsträngiger DNA führt zu lokaler Konzentrierung von DNA und Salz in der flüssigen Phase zwischen den wachsenden Eiskristallen, wobei sich Netzwerke ausbilden, die im Elektronenmikroskop nicht ausgewertet werden können.

2.15.4. Herstellung befilmter Objektträgernetze

Parlodionbefilmte Kupfergrids wurden nach (40) hergestellt.

2.15.5. DNA-Präparationsmethoden

2.15.5.1 Tropfenspreitungsmethode

Die Tropfenspreitungsmethode als Mikroversion einer Standard-Spreitungsmethode in Gegenwart von Formamid (46) wurde erstmals von Inman und Schnös (47) beschrieben. Bei dieser Methode werden für die Herstellung von 3 Präparaten 20 ng DNA benötigt. Abweichend von (40) wurde die nach jeder Spreitung in Chromschwefelsäure gereinigte Siedekapillare nicht nur mit H_2O bidest. gespült, sondern auch mit Hypophase, da für

die Denaturierung von Cytochrom eine minimale Ionenstärke erforderlich ist (48). Auf diese Weise wurden gleichmäßige Spreitungen erzielt. Ausserdem wurden alle Filme 1 Min. nach Spreitung abgenommen.

2.15.5.2 Isodenaturierungsmethoden

Die hier beschriebenen Techniken sind für einen cot-Wert von 10^{-4} Mol s/l und 3 Mikrospreitungen von je 5 µl berechnet.

a) Denaturierung mit NaOH
8 µl DNA-Lösung (1,25 µg/ml) in 10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8,5 wurden mit 1 µl NaOH in einem Eppendorf-Cup vorsichtig durchmischt und 10 Min bei Raumtemperatur denaturiert. Die Probe wurde mit 1 µl 2 M TRIS, 0,2 M EDTA pH 7,2 neutralisiert, durchmischt und 25 s bei Raumtemperatur zur Renaturierung belassen. Danach wurde im Eisbad 10 µl Formamid und 1 µl Cytochrom c-Lösung zugemischt und sofort wie in (40) beschrieben gespreitet (3 Spreitungen à 5 µl).
b) Denaturierung mit Formamid
1 µl DNA-Lösung (10 µg/ml) in 10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8,5 wurde mit 10 µl Formamid gemischt und 10 Min. bei Raumtemperatur denaturiert. Danach wurde die Probe mit 7 µl H_2O und 2 µl Salzlösung verdünnt, gemischt und 72 s bei 15°C renaturiert. Die im Eisbad abgekühlte Probe wurde mit 1 µl Cytochrom c-Lösung vermischt und sofort gespreitet.
c) Hitzedenaturierung
10 µl DNA-Lösung (1,4 µg/ml) in 10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8,5 wurden mit 2 µl Salzlösung gemischt und 1 Min. im siedenden Wasserbad denaturiert. Nach einer Renaturierungszeit von 30 s bei 60°C wurde die Probe ins Eisbad verbracht, mit 10 µl Formamid und 1 µl Cytochrom c-Lösung vermischt und sofort gespreitet.

2.15.5.3 Diffusionsmethode (49)
Die Diffusionsmethode wurde als Mikroversion erstmals von Lang (50) beschrieben. Mit dieser Technik können noch DNA-Lösungen mit 1 ng DNA/ml mikroskopiert werden.

Ein Standardansatz von 30/ul enthielt 1/ul Cytochrom c-Lösung, 1/ul Formaldehyd, Salz mit einer Endkonzentration von 0,14 M NH_4Ac und eine DNA-Konzentration von 0,1/ug /ml. 30/ul-Tropfen wurden auf Teflonplatten pipettiert, die in einer Petrischale von einer dünnen Pufferschicht umgeben waren, und wurden 60 Min. zur Diffusion belassen. Der Puffer der feuchten Kammer enthielt 0,15 M NH_4Ac und 70 mM Formaldehyd. Nach Filmabnahme wurden die Netze gefärbt und dehydriert.

2.15.6. Färbung und Bedampfung

Färbung und Bedampfung wurden nach (40) durchgeführt. Das Färbebad wurde nach 6 Präparaten oder nach 60 Min. erneuert. Schwermetallbedampfung wurde mit einer Hochvakuum-Bedampfungsanlage (Jeol Jee 4 B) bei einem Vakuum von 2×10^{-5} mm Hg, einem Winkel von 7^{o} und einem Glühwendel-Probenabstand von 11 cm mit jeweils 50 mg Palladiumdraht ausgeführt. Der Netzhalter wurde während der Bedampfungszeit manuell mit 1 UPM gedreht. Als Netzhalter wurde eine Messingscheibe (3 cm Ø) mit parallelen 2,6 mm breiten Nuten und 2 mm breiten Stegen verwendet. Die Stege wurden mit Doppelklebeband belegt und gleichzeitig ca. 20 Netze (3 mm Ø) so adaptiert, daß sie auf 2 Stegen jeweils 0,2 mm auflagen. Für weitere Einzelheiten siehe (40).

2.15.7. Elektronenmikroskopie und Dokumentation

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden am EM 9 (Zeiss) mit der Platten-Innenkamera und am EM 109 mit der Aussenkamera (Transfaseroptik) aufgenommen. Die Linsenvergrößerung am EM 109 betrug bei einer Beschleunigungsspannung von 50 kV 12978. Astigmatismuskorrektur erfolgte anhand von Kohlelochfolien bei hoher Vergrößerung. Für statistische Betrachtungen und die Ermittlung von Molekulargewichtsverteilungen wurden Serien von überlappenden Fotografien angefertigt. Da das EM 109 keine Vorrichtung zur definierten Objektverschiebung

besitzt, wurden am Mikroskoptisch gefederte Metallstifte angebracht, die an den Rändelschrauben des Objektvorschubes hörbar rasteten.

2.15.8 Informationsverarbeitung

Die Negative wurden mit einem umgebauten Leitz 6 x 6 Diaprojektor mit einem kurzbrennweitigen Objektiv auf das Meßtablett eines Digitizers (MOB, Kontron) auf eine Fläche von 70 x 110 cm projiziert, mit einem Cursor gemessen, und die Daten direkt von einem HP 9831 A Tischcomputer übernommen. Fehler des optischen Vergrößerungs- und Meßsystems konnten durch lichtstarke Projektion der Negative bei Blende 16 und Ermittlung des Projektionsvergrößerungsfaktors vor jeder Meßreihe mit transparentem Millimeterpapier gering gehalten werden.
Bei der Erstellung eines BASIC-Programmes zur Verarbeitung der Längenmessungen und der Ereignisse auf einzelnen Molekülen wurden ein bereits existierendes Datenübernahmeprogramm (51) und ein Histogrammprogramm von Hewlett-Packard als Unterprogramme übernommen. Das Gesamtprogramm enthielt 7 Unterprogramme, von denen jedes unter einem "Special function key" abgespeichert war.

Jedes Molekül wurde in ein zweidimensionales Feld B(K,J) eingegeben, wobei die Zeile K mit der Molekülnummer identisch war und die Spalten J Einzellängen zwischen Ereignissen auf diesem Molekül enthielten. Die Speicherkapazität des Rechners erlaubte die gleichzeitige Verarbeitung von 200 Molekülen mit je 5 Ereignissen bei 12stelliger Rechengenauigkeit.
Die gemessenen Daten wurden ausgedruckt und auf Band abgespeichert.

3. BESTIMMUNG VON MOLEKULARGEWICHTEN UND MOLEKULARGEWICHTSVERTEILUNGEN MIT ELEKTROPHORESE, SUCROSEGRADIENTENZENTRIFUGATION UND ELEKTRONENMIKROSKOPIE

3.1. Vorbemerkungen

Bei den hier zu untersuchenden Molekulargewichtsverteilungen handelte es sich um Kryolysefragmente (2.8.3.). Nachdem sich in unserem Labor Bestimmungen von Molekulargewichtsverteilungen besonders im Bereich kleiner Molekulargewichte mit der analytischen Ultrazentrifuge als zu aufwendig erwiesen (52), wurde seitdem Sucrosegradientenzentrifugation angewandt. In dieser Arbeit sollte eine genaue Eichung der Sucrosegradienten und ein Vergleich der erhaltenen Molekulargewichtsverteilungen durchgeführt werden mit solchen Verteilungen, die durch Elektrophorese und elektronenmikroskopische Längenmessungen erhalten wurden.
In den Abschnitten 3.2 bis 3.5 wurden zunächst alle 3 Systeme mit DNA-Fragmenten bekannter Länge geeicht, und in Abschnitt 3.5. die Anwendbarkeit der Methoden auf Molekulargewichtsverteilungen geprüft.

Tab. 3.1 Eichfragmente für Elektrophorese und Sucrosegradientenzentrifugation. Molekulargewichte x 10^{-6} für die Endo Eco R I-Fragmente von λ-Wildtyp (53), λplac 5 (54) und T5 st(o) (29) wurden in $s_{20,w}$-Werte nach Studier (37) errechnet. (MW = Molekulargewicht)

λ- Wildtyp			λp lac 5		T5 st(o)	
MW	Fragment		MW	$s_{20,w}$	MW	$s_{20,w}$
2,13	F		2,11	13,6	1,57	12,29
3,48	C		3,57	16,23	9,4	22,81
3,73	E		3,71	16,54	13,5	25,86
3,02	B	B'	4,35	17,47	20,0	29,62
4,74	D		4,67	17,91	29,9	34,04
13,70	A	A'	12,00	24,82		
		A'+F	14,11	26,25		
			30,40	34,24	74,4	46,67
entsprechende Werte für alkalische Sucrosegradienten:						
			15,20	39,39	37,2	56,34

3.2. Molekulargewichtsbestimmungen mit Agarosegel-Elektrophorese

Als Längenmarker für die Flachbett-Agarosegel-Elektrophorese nach 2.14. wurden die in ihrer Länge bekannten Endo Eco R I-Restriktionsfragmente des λ-Wildtyps, der λ-Mutante p lac 5 und der T5 Mutante st(o) verwendet (53, 54, 29). Alle Fragmente sind mit den aus der Literatur berichteten Molekulargewichten in Tab. 3.1 zusammengestellt. Die Anordnung der 6 λ-Restriktionsfragmente (A - F) auf dem λ-Genom geht aus Abb. 3.1 hervor. Fragment A am linken (5') Ende und Fragment F am rechten Ende des Moleküls (3') besitzen einsträngige kohäsive Enden von 12 Basen Länge (55), die in Abhängigkeit von der DNA-Konzentration und Ionenstärke basenpaaren können. Das Assoziationsprodukt wird bei der Elektrophorese als zusätzliche Bande sichtbar (Abb.3.2) bei gleichzeitigem Verschwinden der Bande (F) für das kleinste Fragment.Die Assoziation wurde durch Erhitzen der Restriktionsfragmente vor der Elektrophorese (10 Min, 65°C) und sofortiges Abkühlen und Auftragen vermieden.

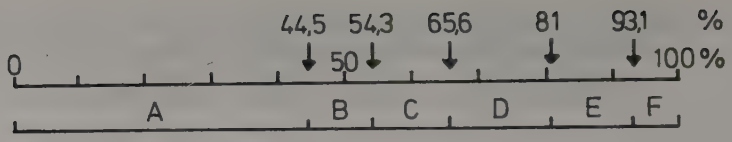


Abb. 3.1 λ-Wildtyp-Genom und Spaltmuster für Endo Eco R I (53) Molekulargewichte der Fragmente A-F siehe Tab. 3.1

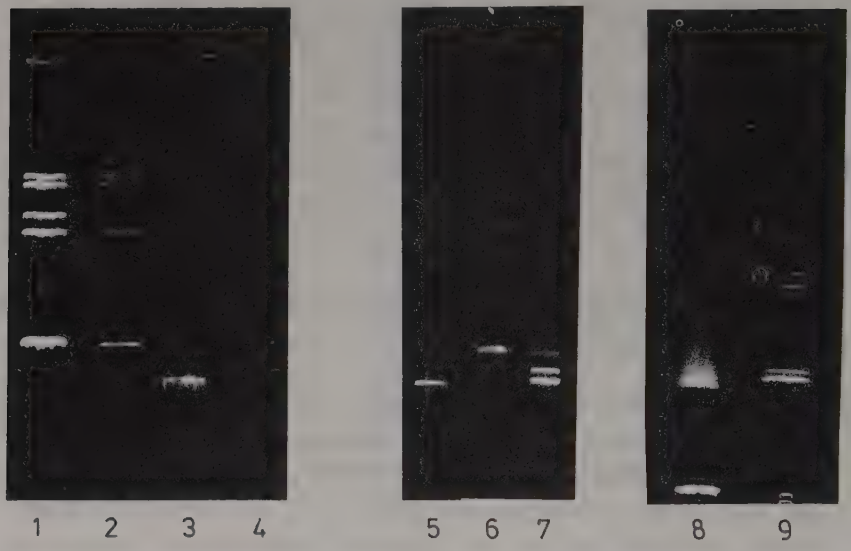


Abb. 3.2 Agarosegelelektrophoresen der Eichfragmente in Tab. 3.1. Gelkonzentration 0,3%, Durchführung nach 2.14. λp lac 5 Fragmente in Bahn 1,6,9. Probe in Bahn 9 wurde vor der Elektrophorese nicht erhitzt. λ-Wildtyp-Fragmente in Bahn 2. T5 st(o) Bahn 3. λp lac 5 Bahn 4,5. T5-Fragmente Bahn 7. Kryolysierte DNA Bahn 8.

Elektrophoresen mit den Restriktionsfragmenten wurden bei verschiedenen Agarosekonzentrationen durchgeführt und Eichkurven ermittelt (Abb. 3.3). Bei einer Auftragsweise log Molekulargewicht gegen die relative elektrophoretische Beweglichkeit (Beweglichkeit des λ-Fragmentes D gleich 1 gesetzt) findet man für kleine Fragmente eine lineare Beziehung, für steigende Molekulargewichte weicht die Eichkurve nach oben ab (56). Der lineare Bereich ist im 0,3%-igen Gel größer als bei einer Agarosekonzentration von 0,7%.

Die infolge von Siebeffekten verminderte elektrophoretische Beweglichkeit hochmolekularer DNA war Anlaß zur Ableitung weiterer mathematischer Beziehungen zwischen Molekulargewicht und elektrophoretischer Beweglichkeit, die teilweise einen größeren Molekulargewichtsbereich linearisieren können (57-59). Theoretisch können die Grenzen der Linearität auch durch eine Senkung der Agarosekonzentration, Erniedrigung der Spannung oder Steigerung der Ionenstärke des Elektrophoresepuffers bis zu einem Molekulargewicht von 500 x 10^6 D erhöht werden (59). Praktisch erwies sich jedoch eine Erniedrigung der Gelkonzentration unter 0,5% als ungünstig, da die Gele zu wenig mechanische Stabilität zum Fraktionieren aufwiesen und sich außerdem die Radioaktivität in den Fraktionen niedrigen Molekulargewichtes zu sehr verdünnte. Eine Erniedrigung der Spannung unter 1 V/cm führte zu Bandenverbreiterung und Verlängerung der Elektrophoresezeit um Tage.

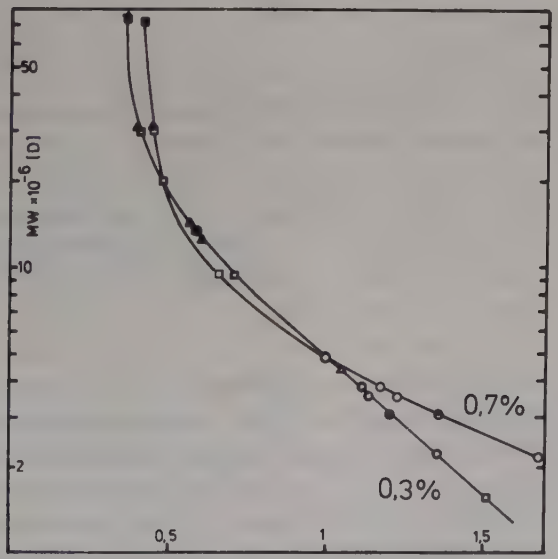


Abb. 3.3 Agarosegelelektrophorese nach 2.14. Gelkonzentration 0,3% und 0,7%. Eichfragmente siehe Tab. 3.1.
Symbole: ■ T5 st(o), □ Endo Eco R I Fragmente von T5
▲ λ p lac 5 und Reassoziationsprodukt A'+F;
△ λ p lac 5 Fragmente A', B'; ◓ λ-Fragment B;
○ λ-Fragmente F, C, E, D.

3.3. Molekulargewichtsbestimmung durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation

Die Eichung der Beckman-Rotoren SW 40 und SW 27 für neutrale und alkalische Rohrzuckergradienten nach 2.13 wurde mit den in Tabelle 3.1 aufgeführten Marker-DNAs durchgeführt. Nach Burgi und Hershey (60) zeigt λ-DNA eine ausgeprägt negative Abhängigkeit der Sedimentationsgeschwindigkeit von der DNA-Konzentration im Auftragsvolumen (61). Bei einer Auftragskonzentration von 22 µg/ml ist die Sedimentationsstrecke um 9,1% geringer als bei 1 µg/ml. Das asymmetrische Sedimentationsprofil bei 100 µg DNA/ml in der Auftragsfraktion (Vol = 0,5 ml) ist in Abb. 3.4 dargestellt.

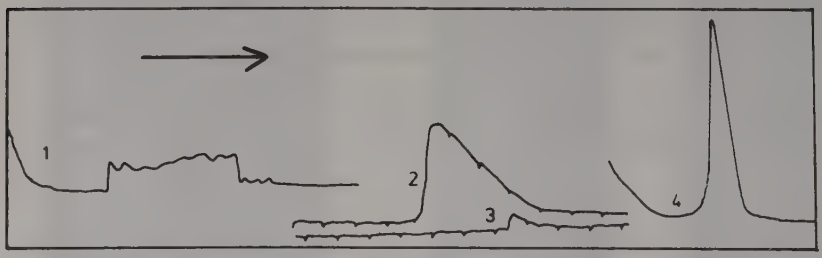


Abb. 3.4 Sedimentationsprofile von λ-p lac 5 DNA in SW-40 Sucrosegradienten. Zentrifugationsbedingungen 2.13. 1) neutraler Gradient, λ-DNA nicht erhitzt vor dem Auftrag, circles, Polymere. 2,3) neutrale Gradienten, DNA-Konzentration in der Auftragsfraktion 100 µg/ml bzw 4 µg/ml.4) alkalisches Sedimentationsprofil. Pfeil = Sedimentationsrichtung. Ordinate $O.D._{254}$

Um konzentrationsbedingte Fehlbestimmungen der s-Werte zu vermeiden, wurde eine λ-DNA mit 2200 IPM/µg DNA hergestellt (2.5.4), die als interner Marker zu analysierenden DNA-Proben zugesetzt wurde.

Bei der Fraktionierung der Gradienten wurden sowohl die Extinktionsprofile mit einem UV-Monitor aufgenommen, als auch die säurefällbare Radioaktivität in den Fraktionen gemessen (Abb. 3.5).

Die λ p lac 5 - Fragmentpaare C,E und B',D werden im Sucrosegradienten nicht voneinander getrennt und stellen sich bei der Extinktionskurve (3.5.a) als Doppelgipfel dar. Der zwei-

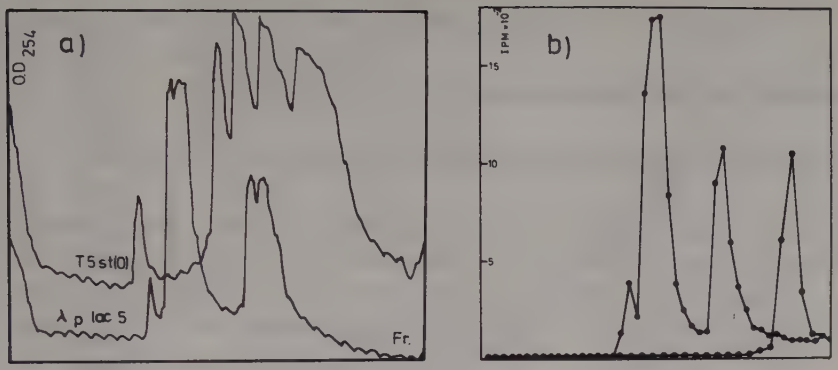


Abb. 3.5 Neutrale SW 40 Sucrosegradienten nach (2.13) mit Eco R I-Restriktionsfragmenten von λ und T5-Mutanten.
a) 2 Extinktionsprofile übereinandergezeichnet. Die in der Grundlinie sichtbaren Zacken wurden durch einen Impulsgeber beim Fraktionswechsel verursacht.
b) Profil der säurefällbaren Radioaktivität von λ(○) p lac 5 DNA und ihren Endo Eco R I-Fragmenten (●).

te Doppelgipfel im selben Diagramm auf der Seite höherer Molekulargewichte erscheint dort, wo nur noch das schwere Fragment A' mit 12 x 10^6 D erwartet wird. Er wird wie bei der Elektrophorese durch teilweise Basenpaarung der kohäsiven Enden von Fragment A' und F erklärt. Alle T5 - Fragmente wurden hingegen gut getrennt.
Zur Ermittlung der Eichkurven für neutrale und alkalische Gradienten (Abb.3.6) wurden die in der Literatur berichteten Molekulargewichte (Tab. 3.1) nach Studier in $s_{20,w}$-Werte umgerechnet (37) und nach Abzug des Auftragsvolumens den Gipfeln der Längenmarker zugeordnet. Die berechneten Regressionsgeraden zeigen einen guten linearen Zusammenhang zwischen s-Wert und Wanderungsstrecke im Sucrosegradienten für beide Zentrifugationssysteme. Außerdem wurde mit λ-DNA bei SW 40-Gradienten geprüft, ob sich verschiedene Zentrifugationszeiten miteinander vergleichen lassen. Mehrere Zentrifugationsläufe wurden zwischen 2 und 9,5 h abgebrochen und die den Zentrifugationszeiten zugehörigen Fraktionen bestimmt und in Diagramm 3.6.a dargestellt. Auch dieses Schau-

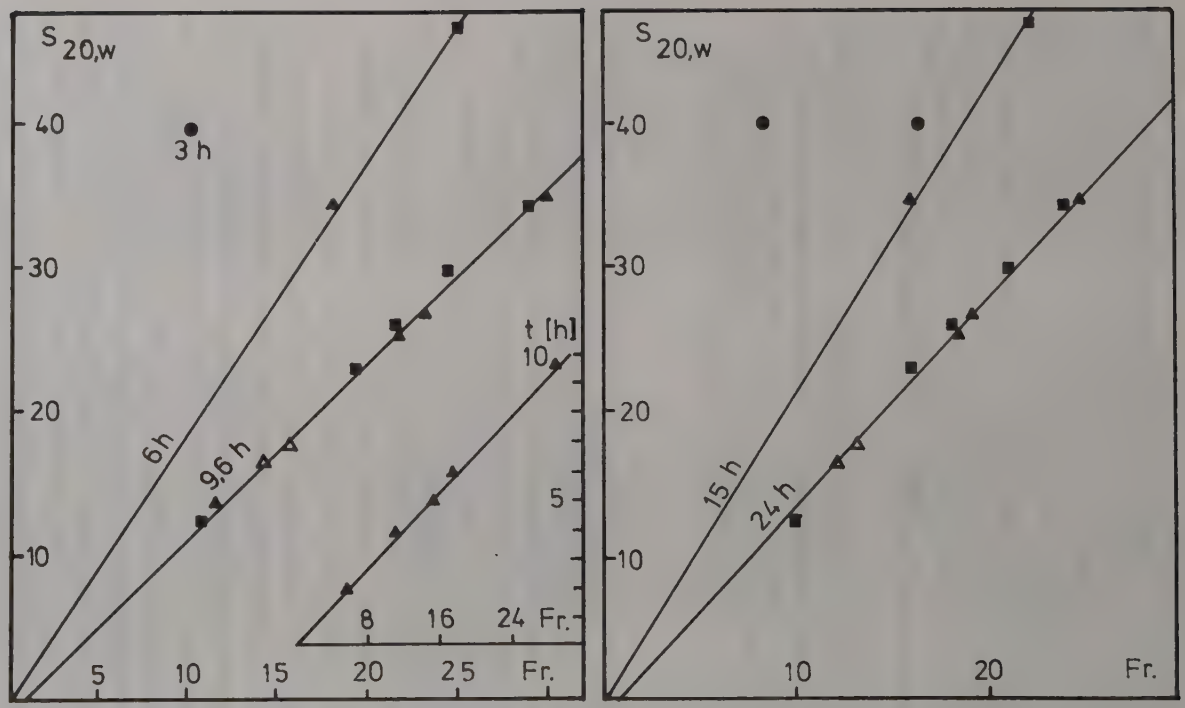


Abb. 3.6 Neutrale und alkalische Sucrosegradientenzentrifugation nach (2.13).a) SW 40; b) SW 27; Eichfragmente siehe Tab 3.1:▲ λp lac 5 DNA und Endo Eco R I Fragmente; △ nicht getrennte Fragmentpaare C,E und B',D; ■ T5 st(o) und seine Restriktionsfragmente; ● alkalische Gradienten mit λ-DNA.

bild zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Sedimentationszeit und Fraktion und damit den isokinetischen Charakter der SW 40-Sucrosegradienten.

3.4. Elektronenmikroskopische Molekulargewichtsbestimmung

Molekulargewichtsbestimmungen von Nucleinsäuren können auf direktem Wege auch durch Längenmessungen an elektronenmikroskopischen Bildern ermittelt werden. Für den Zusammenhang zwischen Länge, Basenpaaren und Molekulargewicht doppelsträngiger DNA gilt die Beziehung (62):

$1\,\mu m = (2{,}05 \pm 0{,}1) \times 10^6\ D = 3000$ Basenpaare

Dieser Umrechnungsfaktor gilt jedoch nur für einen Ionenstärkebereich von 0,1 - 0,5 M (63), der sowohl für Spreitungs- als auch Diffusionsmethoden eingehalten wurde.
Trotzdem ist bei jeder Einzelmessung mit einem Probenfehler zu rechnen, der durch Salz- und Formamidgradienten während der Spreitung zu lokalen Schwankungen des Längen-Massen-Verhältnisses führen kann. Dieser nichtsystematische Fehler kann nur durch eine Vielzahl von Einzelmessungen vermindert werden.
Für den Zusammenhang zwischen Molekülläge L und Standardabweichung gilt die Beziehung (46):

$$\sigma = k \cdot \sqrt{L}$$

Die zweite Ebene, die als Ursache für falsche Längenbestimmungen infrage kommt, ist das Mikroskop selbst. Schwankungen der Linsenspannung und der Hysterese, Änderungen des Abstandes zwischen Objektebene und Objektivlinsenebene durch gewölbte Trägernetze und sphärische Linsenfehler beim Mikroskopieren außerhalb der optischen Achse verursachen nach allgemeinen Erfahrungen Fehler um 1%.
Der Gesamtfehler des optischen Vergrößerungs- und Meßsystems wurde durch 100 Einzelmessungen an verschiedenen Stellen des Meßfeldes (2.15.8) mit 1,7% ermittelt (n= 100, l= 100 mm)
Der für meine Arbeitsbedingungen vom Mikroskophersteller angegebene Vergrößerungsfaktor von 12.978 wurde zur Berechnung des Gesamtvergrößerungsfaktors ungeprüft übernommen.

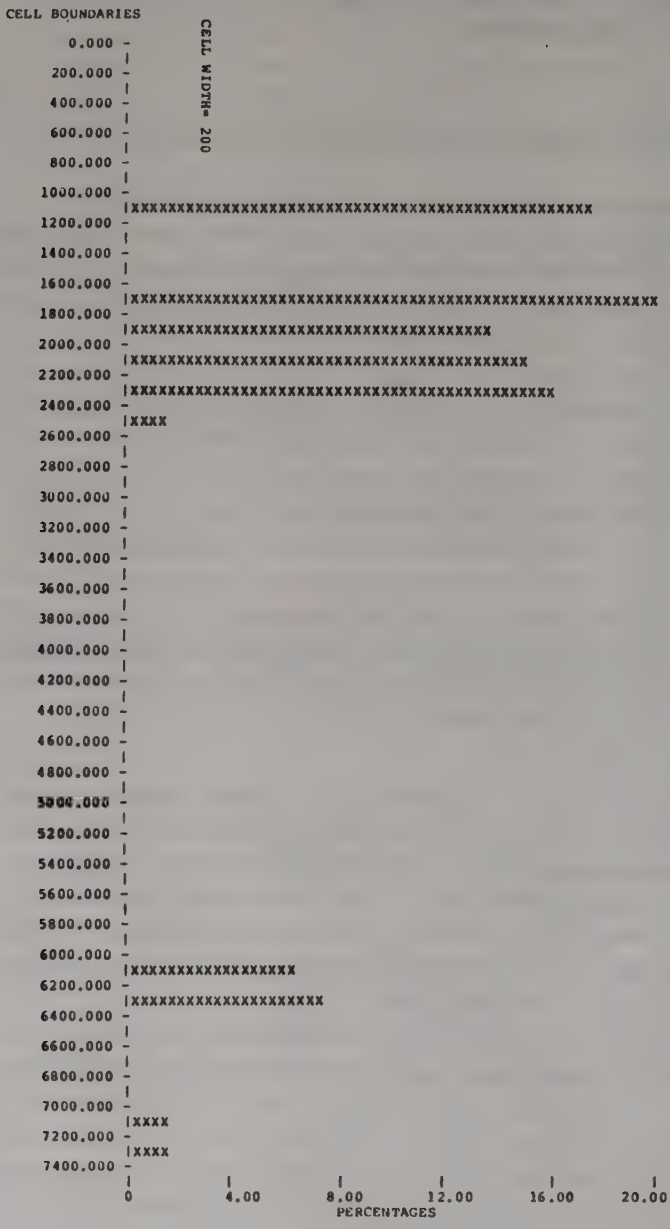


Abb. 3.7 a Längenhistogramm von 150 λ p lac 5 Endo Eco R I Restrictionsfragmenten gemessen an einem gespreiteten Präparat. Abszisse: Länge in nm, Klassenbreite 200 nm, Ordinate: relative Häufigkeit in Prozent

Abb. 3.7. b Längenhistogramm der Fragmente aus Abb. 3.7.a bei einer Klassenbreite von 50 nm. Oberhalb 5700 nm sind Fragmente aus einem entsprechenden Präparat nach der Diffusionsmethode dargestellt.

Üblicherweise werden für Längenmessungen im Elektronenmikroskop den zu untersuchenden Fragmenten circuläre Marker-DNAs zugemischt. Dies ist jedoch für die Ermittlung von Molekulargewichtsverteilungen kein gangbarer Weg, da ein nicht kalkulierbarer Anteil der circulären Moleküle linear wird und das Verteilungsmuster der Kryolysefragmente verfälschen würde.

Die gesamte Meßkette von der Spreitung bis zum Tischrechner wurde mit Restriktionsfragmenten von λ p lac 5 DNA überprüft. Das Längenhistogramm von 150 gespreiteten Fragmenten ist in Abb. 3.7a zu sehen. Durch die Wahl engerer Klassen (50 nm) können die Säulen, die jeweils ca. 17% der Moleküle repräsentieren, in breitere Gipfel mit dazwischenliegenden Minima aufgetrennt werden (Abb.3.7.b). Das längste Fragment mit ca. 7200 nm ist durch kovalente Basenpaarung der beiden λ-Fragmente A'und F entstanden.

In Tabelle 3.2 werden Längenmessungen miteinander verglichen, die von Präparaten nach der Spreitungs- und Diffusionsmethode gewonnen wurden (n= 150 bzw. 200). Die gemessenen Längen wurden nach (62) in Molekulargewichte umgerechnet und stimmen ziemlich gut mit den durch Agarosegel-Elektrophorese ermittelten Literaturwerten überein (54). Die nach der Spreitungsmethode ermittelten Längen sind durchschnittlich um 2,7% größer als die entsprechenden der Diffusionsmethode.

Tab. 3.2 Längenmessungen an λ p lac 5 und seinen Endo Eco R I Fragmenten bei verschiedenen Präparationsmethoden (Gipfel der Längenhistogramme von Abb. 3.7.b) Molekulargewicht x 10^{-6} errechnet mit dem Faktor 2,05 nach (62).

		Diffusion		Spreitung	
Fragment	MW (54)	/um	MW	/um	MW
F	2,11	1,06	2,17	1,12	2,29
C	3,75	1,73	3,54	1,77	3,63
E	3,71	1,82	3,73	1,86	3,81
B'	4,35	2,12	4,34	2,15	4,41
D	4,67	2,32	4,75	2,32	4,75
A'	12,00	6,03	12,36	6,18	12,66
A'+F	14,11	7,07	14,49	7,22	14,80
A - F	30,4	15,08	30,91	15,40	31,57
λ-circulär		14,18	29,06		

Der Messwert "λ-circulär" wurde durch 40 Einzelmessungen an 8 nach der Diffusionsmethode präparierten Molekülen ermittelt und liegt um 4,4% niedriger als der Literaturwert (65).

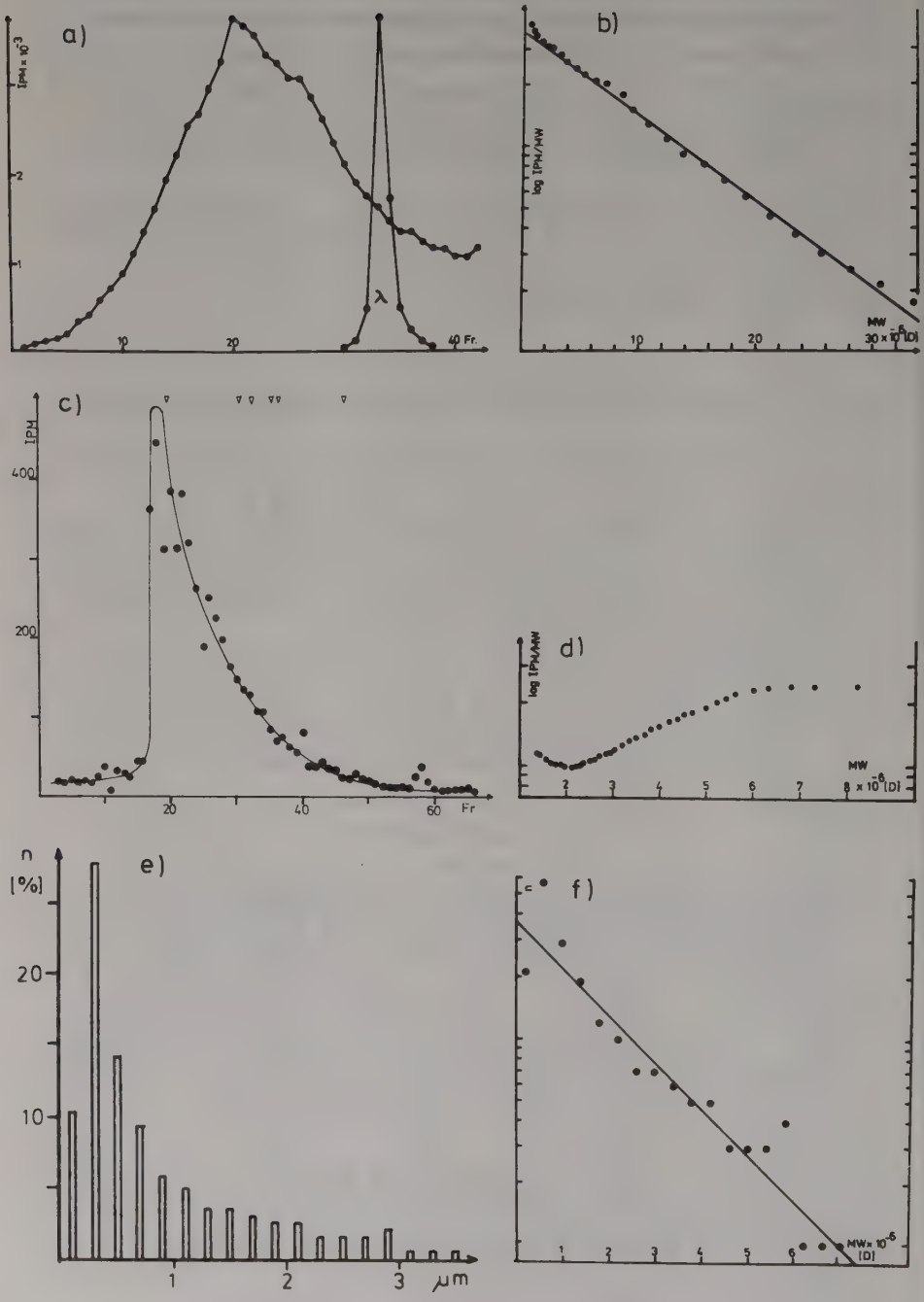
Angesichts dieser nichtsystematischen Abweichungen der MW-Erwartungswerte von den tatsächlich gemessenen wurde der vom Mikroskophersteller angegebene Gerätevergrößerungsfaktor bei den hier gewählten Arbeitsbedingungen (2.15.7) und der Umrechnungsfaktor von /um in Molekulargewicht (62) ohne weitere Korrekturfaktoren für die Ermittlung von Molekulargewichtsverteilungen übernommen.

3.5 Molekulargewichtsverteilung von Kryolysefragmenten

Nach der Literatur (21,64) handelt es sich bei der Kryolyse von DNA um einen Poisson-Prozess. Dadurch muß es sich aus theoretischen Gründen bei der Größenverteilung der durch Kryolyse erzeugten Fragmente um eine Exponentialverteilung handeln, die im halblogarithmischen Diagramm (Häufigkeit gegen Länge) einer Geradengleichung folgt.
Kryolysefragmente wurden mit Sucrosegradienten, Elektrophorese und Elektronenmikroskopie analysiert und die erhaltenen Verteilungen auf Exponentialverteilung geprüft und in Abb. 3.8 gegenübergestellt. Die Ermittlung der relativen Häufigkeit von einheitlich mit 14-C markierten Molekülen einer bestimmten Länge in Sucrosegradienten- und Elektrophoresefraktionen erfolgte durch Division der IPM/Fraktion durch das mittlere Molekulargewicht der betreffenden Fraktion. Das mittlere Molekulargewicht jeder Sucrosegradientenfraktion wurde unter der Annahme eines linearen Zusammenhanges zwischen s - Wert und Fraktionsnummer (bei diesem Experiment 1,04 s/Fr.) nach (37) errechnet. Bei den analysierten Fragmenten ist exponentielle Verteilung über einen Molekulargewichtsbereich von 1 bis 30 x 10^6 D hervorragend verwirklicht.

Dieselbe kryolisierte DNA wurde durch Elektrophorese analysiert. Die mittleren Molekulargewichte pro Fraktion wurden anhand einer Eichkurve von Markermolekülen ermittelt, die

Abb. 3.8


a)
IPM x 10^-3
λ
40 Fr.
b)
log IPM/MW
MW
c)
IPM
Fr
d)
log IPM/MW
MW
e)
n
[%]
μm
f)
MW x 10^-6 [D]

auf parallelen Gelbahnen mit elektrophoretisiert wurden. Die Auftragung log (IPM/MW) gegen MW zeigt hier ein von einer Exponentialverteilung stark abweichendes Bild für Molekulargewichte über 2 x 10^6 D. Da die Zunahme der Häufigkeit der Fragmente im Bereich zwischen 2 und 6 x 10^6 D entsprechenden Ergebnissen der Zonensedimentation und der Elektronenmikroskopie (s.u.) völlig widerspricht, muß die errechnete Verteilung als falsch angesehen werden. Eine mögliche Ursache für diese Fehlbestimmung ist, daß die Wanderungsstrecken diskreter Fragmentlängen nicht auf Molekulargewichtsverteilungen übertragbar sind, so daß die nach der Eichkurve pro Fraktion ermittelten Molekulargewichte mit den tatsächlichen nicht übereinstimmen.
Dies scheint auch der Grund dafür zu sein, daß man in der Literatur keine Arbeiten über die Ermittlung von Molekular-

Abb. 3.8 Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung kryolisierter DNA. Vergleich von Sucrosegradientenzentrifugation, Elektrophorese und Elektronenmikroskopie.

a) neutraler SW 40 Sucrosegradient nach 2.13, Laufzeit 9,25 h; Mit 14C -λ Marker-DNA wurden in einem zweiten Zentrifugenröhrchen im selben Rotor 1,04 s/Fr. ermittelt.
b) Prüfung der Daten von a auf exponentiale Verteilung.
c) Elektrophorese derselben kryolisierten DNA nach (2.14). Gelkonzentration 0,7%; 1V/cm; Fraktionsbreite 2 mm; Elektrophoresedauer 25 h; ∇ Eco R I Fragmente von λp lac 5.
d) Prüfung der Daten von b auf Exponentialverteilung MW 2,4,6,8 x 10^6 D entspricht den Fraktionen 49, 33, 24, und 20,5.
e) Elektronenmikroskopisches Längenhistogramm n= 400
f) Prüfung der Daten von e auf Exponentialverteilung.

gewichtsverteilungen in dem hier angestrebten Molekulargewichtsbereich zwischen 0,1 und 50 x 10^6 D findet. Die vorliegenden Arbeiten über die elektrophoretische Analyse von Restriktionsfragmenten von Chromatin und neusynthetisierter DNA (66-69), erheben entweder nur den Anspruch, grobe Schätzwerte für die Fragmentverteilungen zu liefern, oder die zu analysierenden Proben enthielten interne Längenmarker (70).
Durch Trocknung und Autoradiographie der Gele nach (71) wäre möglicherweise eine bessere Zuordnung der Eichfragmente zu den Fraktionen der Kryolysefragmente möglich gewesen, die lange Expositionszeit schränkt die Anwendbarkeit dieser Technik jedoch für diese Problemstellung ein.

Das elektronenmikroskopisch ermittelte Längenhistogramm kryolisierter DNA beruht auf 400 Einzelmessungen; Moleküle unter 0,1 µm wurden nicht berücksichtigt. Diese Molekulargewichtsverteilung kommt der tatsächlichen Verteilung wohl am nächsten, da durch Elektronenmikroskopie Einzellängen und Häufigkeiten direkt ohne Umrechnungsfaktoren ermittelt werden.
Die Prüfung auf logarithmische Verteilung der Fragmente wurde bis zu einem Molekulargewicht von 7,2 x 10^6 D durchgeführt. Der Logarithmus der Häufigkeit zeigt in Anbetracht der beschränkten Anzahl von Messungen (n= 400) zum Molekulargewicht einen linearen Zusammenhang.

Zusammenfassend läßt sich über die Anwendbarkeit der 3 beschriebenen Methoden zur Ermittlung von Molekulargewichtsverteilungen folgendes sagen:

- Die Elektronenmikroskopie liefert oberhalb einer Minimallänge von 0,05 µm bis zu ca. 30 µm die genauesten Molekulargewichtsverteilungen. Sie ist jedoch sehr zeitraubend und im Routinebetrieb nicht anwendbar.
- Nucleinsäuren zeigen bei der Elektrophorese ein zur lokalen DNA-Konzentration im Agarosegel positiv korreliertes Laufverhalten (39), was ihre Anwendbarkeit auf kontinuierliche Verteilungen stark einschränkt.
- Sucrosegradientenzentrifugation liefert, sofern die Gradienten nicht überladen werden, für exponentiell verteilte Fragmente hinreichend genaue Molekulargewichtsverteilungen zur Beurteilung einer DNA-Fragmentierung mittels Kryolyse.

4. "INVERTED REPEAT"-SEQUENZEN UND IHRE BEZIEHUNG ZUM REPLIKATIONS-URSPRUNG

4.1. Einleitung

Die DNA von nahezu allen bislang untersuchten Organismen, beginnend bei Bakteriophagen bis hin zu eucaryontischer DNA enthält Nucleinsäuresequenzen mit zweifacher Rotationssymmetrie, die man als Palindrom oder als inverted repeat-Sequenz (i.r.Sequenz) bezeichnet (Abb. 4.1).

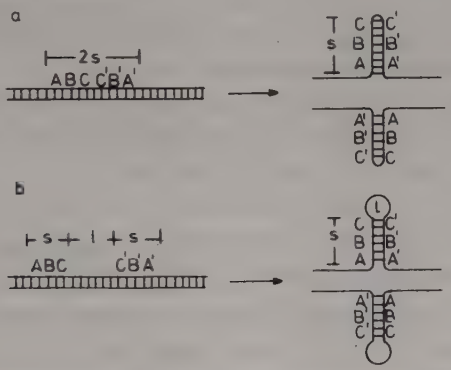


Abb. 4.1 Palindrome oder inverted repeat Squenzen nach (72). Beide Typen (a und b) bestehen aus 2s Nucleotiden, die mit Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüft sein müssen um ein "hairpin"auszubilden. Im Gegensatz zu a ist in b das repeat-Paar durch eine Fremdsequenz der Länge 1 (loop) unterbrochen.

Die Sequenz ABC-C'B'A' oder ABC-1-C'B'A', also ohne oder mit loop (Schleife) kann von Oligonucleotiden bis zu mehreren 1000 Nucleotiden lang sein.
Der methodische Nachweis für i.r.Sequenzen wird durch Hydroxylapatit (HAP)-Chromatographie und Elektronenmikroskopie geführt. Denaturiert man eine Nucleinsäure und läßt für die Renaturierung so wenig Zeit, daß sich nur komplementäre Basen innerhalb eines Moleküls wiederfinden können und keine bimolekularen doppelsträngigen Moleküle entstehen -daher

der Name fold back oder snap back DNA-, so können diese doppelsträngigen Strukturen entweder durch ihre HAP-Bindung bei höherer Ionenstärke oder durch ihren kräftigeren Kontrast im Elektronenmikroskop von der Einstrang-DNA unterschieden werden. Die Bindungsfestigkeit an HAP als Trennkriterium hängt von der thermischen Stabilität der i.r.Sequenzen ab, und damit direkt von Fragmentlänge, Basenzusammensetzung, Temperatur und Ionenstärke (33,72). Bei Fragmentlängen von 1 µm sind ca. 50 gepaarte Basen notwendig, um ein solches Fragment sicher von der einsträngigen DNA abzutrennen (19). Im Elektronenmikroskop läßt sich fold back DNA mit der Standardspreitungsmethode nach Kleinschmid (73) sogar erst dann sicher als Haarnadelschleife (hairpin) erkennen, wenn der doppelsträngige Stamm ca. 100 Basenpaare enthält.
In der Literatur tauchen einerseits Artikel auf, die von i.r.Sequenzen bei Bakteriophagen und Bakterien sprechen (74), andererseits gibt es Autoren, die i.r.Sequenzen als eine Spezifität eucaryontischer DNA bezeichnen (19). Dieser scheinbare Widerspruch beruht auf der methodischen Nachweisgrenze für i.r.Sequenzen. Mit HAP-Chromatographie ist es tatsächlich nicht möglich, beispielsweise aus E.coli oder dem Phagen T7 signifikante Mengen i.r.Sequenzen zu isolieren (19).

Es sind jedoch viele kleine Palindrome in prokaryontischen Systemen als Ort spezifischer Wechselwirkung von DNA bindenden Proteinen bekannt. Lange i.r.Sequenzen bis zu 5000 Nucleotidpaaren findet man als "integrierte Segmente" in Transposons und Plasmiden (75). Bei helikalen circulären DNAs ermöglichen Palindrome die Ausbildung einer Kreuzstruktur (Abb.4.2), deren natürliches Vorkommen durch spezifische Spaltung mit einer unspezifischen Einstrangnuclease im hairpinloop nachgewiesen wurde (76). Auch die sequenzierten Replikationsursprünge (Origins) der Phagen M 13, G 4, und Ø X enthalten i.r. Sequenzen von ca. 20 Basenpaaren Länge, die erwiesenermaßen eine Haarnadelschleife ausbilden und an denen die Replikation mit einem RNA-Primer startet (77). Das erst kürzlich sequenzierte E.coli-Origin besitzt weitgehende Sequenzhomologie zum Replikationsursprung von S. typhimurium und enthält mehrere i.r.Paare mit Loops (78)(Abb.4.3)

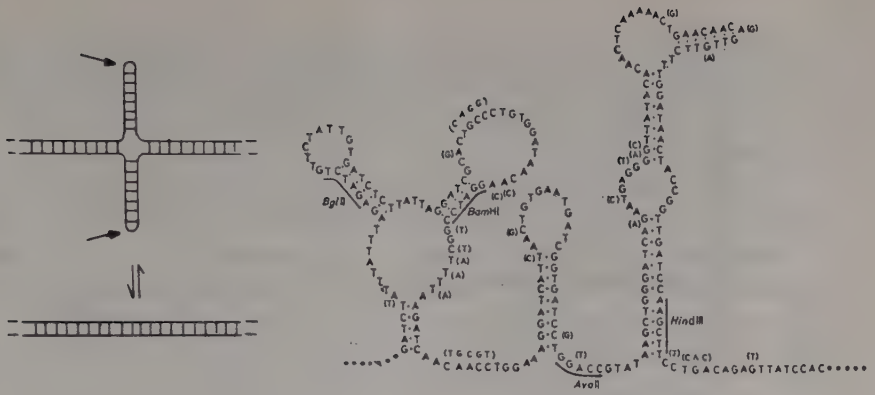


Abb. 4.2 Kreuzformstruktur eines Palindroms nach (76); Einstrangnuclease spaltet spezifisch in der Biegung (turn around sequenz) Pfeil.

Abb. 4.3 Mögliche Sekundärstruktur des E coli Replikationsursprungs nach (78). In Klammern die ausgetauschten Basen für S. typhimurium.

Bei Eucaryonten-Viren wurden große terminale i.r.Sequenzen mit bis zu 11.550 Basenpaaren beschrieben (Tab 4.1). Alle bislang aufgeklärten Replikationsursprünge enthalten zugleich i.r. Sequenzen. Daneben haben viele virale i.r.Sequenzen mit Loop auch eine gut aufgeklärte Funktion beim "Splicing" von polycistronischer pre-mRNA (79). Eine gemeinsame "Leader"-Sequenz kann mit mehreren, den Strukturgenen vorausgehenden Sequenzen basenpaaren und durch intramolekulare Ligation zu monocistronischer m-RNA verkürzt werden.

Tab. 4.1 Einige Eucaryontenviren, deren Replikationsursprünge aufgeklärt sind und die i.r. Sequenzen enthalten.

Parvoviren (80):	BK-Virus (82)
Papovaviren:	Polyoma V. (82,83) Simian V. 40 (82,84)
Adenoviren:	AD 2 (79,85) AAV (81)
Herpesviren:	H. simplex (86,87)
Pockenviren:	Vaccinia (88,89) Rabbit pox (90)
Hepatitis B	(82)

Tab. 4.2 VERGLEICH VON INVERTED REPEATS UND INITIATIONSSTELLEN IN EUCARYONTEN

Spezies	i.r.Anzahl pro m	i.r.Sequenzen mit Loop %	Loop-Länge /um	Stammlängen /um	Stammlängen /um	Spacer zwischen i.r. Sequenzen /um	Autoren	Replikonlängen /um	Autoren
Physarum	400.000	-	0,75	0,13	0,27	2,3	(96)	-	-
Xenopus	120.000	-	-	0,2	-	8,3	(19,97,98)	18 - 128	(99)
Drosophila	77.000	80	0,9	0,45		13,0	(100,101)	-	
	13.000	-	-	-	-	75,0	(19)	-	-
Säuger									
Muntjac	-	-	-	-	-	-	-	16	(91)
Cattle MDBK	-	-	-	-	-	-	-	17 - 34	(13,91)
Chinese Hamster CHO	250.000	70	-	0,1		4,0	(94,102)	-	-
Syrischer Hamster BHK	-	-	-	-	-	-	-	30	(13)
Maus L929	-	-	-	-	-	-	-	39	(91)
Maus L929	-	-	-	-	-	-	-	45	(13)
Maus L	15.000	-	-	-	-	62,1	(19)	-	-
Maus SVT2	36.000	59	0,9	0,33		28,0	(103)	-	-
Ehrlich Ascites	150.000	-	-	0,03	-	6,6	(104)	61 - 72	(105)
Human HEK	-	-	-	-	-	-	-	23	(13)
Human Placenta	200.000	64	0,8	0,1	0,1	5,0	(106)	-	-
Human HELA	70.000	-	-	0,2	-	13,5	(19)	-	-
Human HELA	909.000	-	-	0,06		1,1	(107)	-	-
Human HELA	150.000	-	-	0,1		6,6	(108)		
Afrikan. grüner Affe CV1	-	-	-	-	-	-	-	42	(13)

Auch bei einigen Eucaryonten wurden bislang Untersuchungen über i.r.Sequenzen durchgeführt (Tab. 4.2). Hier stellte sich heraus, daß mit wachsender Fragmentgröße der denaturierten DNAs bis zu ca 25% der Moleküle fold back Sequenzen enthalten und an HAP binden. Die durchschnittlichen Stammlängen sind etwa 300 Nucleotide. Die untersuchten Eucaryonten haben meist mehr i.r. Sequenzen mit Loop als ohne Loop. Die beobachtete Verteilung der i.r.Sequenzen über das Genom erscheint im allgemeinen stochastisch, jedoch in Gruppen von 2 bis 3 i.r. Sequenzen. Die Abstände zwischen 2 i.r.Sequenzpaaren schwanken zwischen 1,5 und 75 /um.

Die Replikation von DNA in Säugerzellen wird in der S-Phase an ca. 50-100 000 Initiationsstellen (Origins) initiiert (13, 91,92). Die physikalischen Eigenschaften dieser Replikationsursprünge sind nicht bekannt. Man muß aber annehmen, daß es sich hierbei um spezifische Erkennungsstellen für Proteine handelt, die an der Initiation neuer DNA-Ketten beteiligt sind und daß diese Sequenzhomologien haben. Da die DNA-Replikation von den meisten Origins aus bidirektional abläuft, sollte man erwarten, daß diese Strukturen zweifache Rotationssymmetrie haben (93). I.r. Sequenzen sind mögliche Kandidaten für solche Replikationsorigins. Überall wo Vergleiche zwischen der Anzahl der Initiationsstellen und der Zahl der i.r. Sequenzpaare möglich sind, findet man mehr i.r. Sequenzpaare als Initiationsstellen. Eine Beteiligung der i.r. Sequenzen an der Initiation der Replikation schließt nicht aus, daß ein Teil von ihnen außerdem bei der Regulation der Transcription oder im posttranscriptionalen Processing eine Rolle spielt (94,95).

Zum Problem der Sequenzhomologien wurden erst kürzlich von Jelinek et al. (82) Vergleiche zwischen den i.r.Sequenzen in humaner DNA, doppelsträngigen HeLa hn-RNA Sequenzen und i.r. Sequenzen von chinesischen Hamster (CHO)-Zellen angestellt. Dabei zeigte sich, daß ein Abschnitt von ca. 30 Basen Länge sich über die Säugerevolution erhalten hat. Dieser konservative Abschnitt Säuger-DNA wurde ebenfalls am Replikationsorigin der Säugerviren BK, SV 40 und Polyoma gefunden. All diese i.r. Sequenzen enthalten eine Schnittstelle für das Restrik-

tionsenzym Alu und werden deshalb auch als Alu-Familie bezeichnet (82). Von ihrer gemeinsamen Vorläufersequenz haben sie über die Evolution hinweg durchschnittlich 12% der Basen ausgetauscht (82). Es ist relativ unwahrscheinlich, daß diese Homologien zwischen zellulären i.r. Sequenzen und den viralen Sequenzen an deren Origins rein zufällig entstanden sind.

Die Hypothese, daß i.r. Sequenzen als potentielle Initiationsstellen der DNA-Replikation fungieren, sollte in der vorliegenden Arbeit am Modell von Ehrlich Ascites Tumorzellen mit Hilfe spezieller Radioisotopenmarkierungen näher untersucht werden. Im ersten Teil dieser Arbeit (4.3) wurde versucht, mit ^{3}H-Pulsmarkierungen die DNA-Initiationsstellen zu markieren und mit einer einheitlichen ^{14}C markierten DNA zu vergleichen. Um sicher zu gehen, daß die Methodik zur Abtrennung von i.r.Sequenzen von der Gesamt-DNA und der Maus-Satelliten-DNA mit anderen oben angeführten Arbeiten (Tab. 4.2) vergleichbar ist, wurde außerdem in Abschnitt (4.4) eine elektronenmikroskopische morphologische Charakterisierung der i.r. Sequenzen aus Ascites-DNA durchgeführt.

4.2. Methodische Probleme bei der Anreicherung von i.r.-Sequenzen aus Ehrlich Ascites Hauptbanden DNA

Unsere Ehrlich Ascites Tumorzellen sind eine kontinuierliche Zellinie mit etwa 14 pg DNA pro Zelle, was einer Länge des haploiden Genoms von ca. 1 m entspricht (109). In dieser DNA sind hochrepetitive Satellitensequenzen enthalten, die auf alle Chromosomen verteilt sind und etwa 8% der Gesamt-DNA ausmachen (110). Dieser Satellit läßt sich von der nichtrepetitiven DNA (76% der gesamten DNA), der mittelrepetitiven DNA (15% der gesamten DNA, Repetitionsfrequenz 2×10^{4}) und der fold back DNA (1% der gesamten DNA) durch isopyknische Gradientenzentrifugation abtrennen (111). Die Ascites-Hauptbanden DNA (verbleibende 90%) wird danach fragmentiert, zu Einzelsträngen denaturiert und bei niedrigen cot-Werten ($\leq 10^{-4}$), bei denen nur eine konzentrationsunabhängige intramolekulare Basenpaarung möglich ist, mit der HAP-Technik ana-

lysiert. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, die ca 1% fold back DNA vollständig von der Hauptbanden DNA abzutrennen. Von diesem Material können Präparate für die elektronenmikroskopische Auswertung über Struktur und Größenverteilung der i.r. Sequenzen angefertigt werden.

4.2.1. Satellit-DNA Abtrennung

Die Satellit-DNA der Maus ist AT-reich (34,2% GC (110)) gegenüber 44% GC im Gesamtgenom und unterscheidet sich von der Hauptbande im isopyknischen CsCl-Gradienten durch eine geringere Schwebedichte (1,69 gegenüber 1,70 g/ml(30)). Diese Schwebedichteunterschiede können durch Zusatz von Silberionen im chloridfreien Cs_2SO_4-Gradienten auf 1,501 g/ml für die Hauptbande und 1,456 g/ml für die Satellitenbande vergrößert werden, wodurch eine Trennung in einem Zentrifugationsschritt möglich wird. Die Stöchiometrie des Silber-DNA Mischungsverhältnisses orientiert sich an den Bindungskonstanten der Ag^+-Ionen zu den Basenpaaren. Bei niedrigen Silberkonzentrationen und einem pH von 8 bindet zunächst ein Ag^+-Ion pro GC-Basenpaar unter Protonenfreisetzung an Guanin-N7 (112). Im Gegensatz zu dieser kooperativen Komplexbindung bindet bei höheren Silberkonzentrationen ein Ag^+-Ion an jedes Basenpaar mit einer niedrigeren Bindungskonstante (113). Denaturierte oder einsträngige DNA bindet Silber noch stärker als native DNA (114).
In meinen Gradienten wurde ein molares Verhältnis von Ag^+/ DNA-PO_4 von 0,27 gewählt. Bei Gradienten mit insgesamt weniger als 50 ug DNA wird dieses Verhältnis durch Spuren von Chlorid, Protein oder anderen Verunreinigungen leicht verfehlt. Die Molarität der $AgClO_4$-Stammlösung wurde gravimetrisch kontrolliert, da das Salz hygroskopisch ist. Der Einfluß einer Über- und Untertitration um je 25% von Ag^+ auf die Verschiebung der Hauptbande ist in Abb. 4.4 dargestellt. Ausgehend von einer von mir für Ascites-DNA ermittelten Schwebedichte (Abb.4.4.a) von 1,43 g/ml ((115) 1,423 g/ml) verschiebt sich die Hauptbande bei einem Ag^+/DNA-P Verhältnis von 0,2 ,

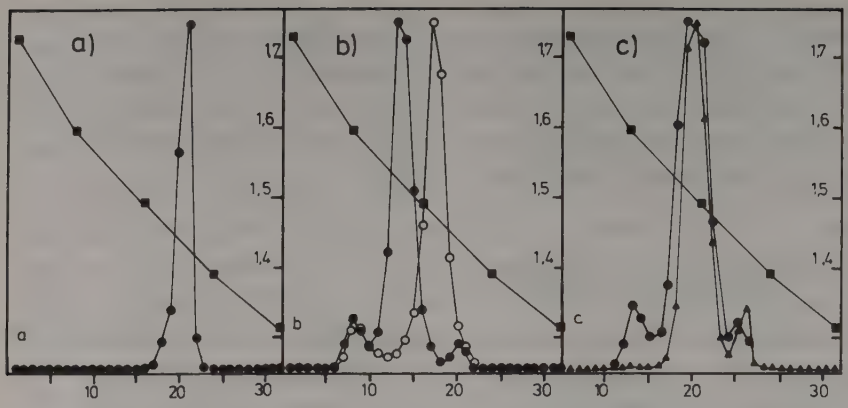


Abb. 4.4 Isopyknische Cs_2SO_4/Ag^+ Gradienten mit Ascites-DNA. Abszisse Fraktion, Ordinate IPM normiert, Dichte g/ml; 3H DNA = 5 Min. Puls, 8 Min. nach Aufhebung der Anaerobie; 14C DNA = Langzeitmarkierung; siehe (2.7) a) 2,8 µg 3H DNA ohne Ag^+ b) 2 Gradienten ineinandergezeichnet mit je 100 µg 3H DNA und einem Ag^+/DNA-P Verhältnis von 0,2 ○ und 0,33 ● .c) 1 Gradient mit 300 µg 14C DNA ▲ und 230 µg 3H DNA ● .

0,27 und 0,34 immer mehr zu größeren Dichten: 1,47, 1,505 und 1,52 g/ml. Die Satellit-DNA bleibt zunächst bei 1,44 g/ml liegen. Der von der Ag^+Konzentration in diesen Grenzen unabhängige Vorgipfel der 3H DNA mit einer Schwebedichte von 1,59 g/ml enthält einsträngige DNA. Er tritt bei einer im gleichen Zentrifugenröhrchen enthaltenen 14C langzeitmarkierten DNA nicht auf, obwohl diese parallel unter identischen Bedingungen aufgearbeitet wurde. Der 3H-Puls-DNA-Vorgipfel enthält DNA hoher spezifischer Aktivität und ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von Einstrang-Gaps am Replikationsort (siehe 4.3.1).

Nach (116) ist die Breite einer Bande in isopyknischen Gradienten der Wurzel des reziproken Molekulargewichtes und außerdem der Wurzel der Gradientenbeladung (Masse m) proportional. Dies ist der Grund dafür, daß sich der Satellit bei hochmolekularer DNA viel besser abtrennen läßt als beispielsweise bei niedermolekularen Ultraschallfragmenten (Abb. 4.5). Die Qualität der Satellitabtrennung wird durch hohe Fragmentlängen nicht verschlechtert und bleibt quantitativ (111),

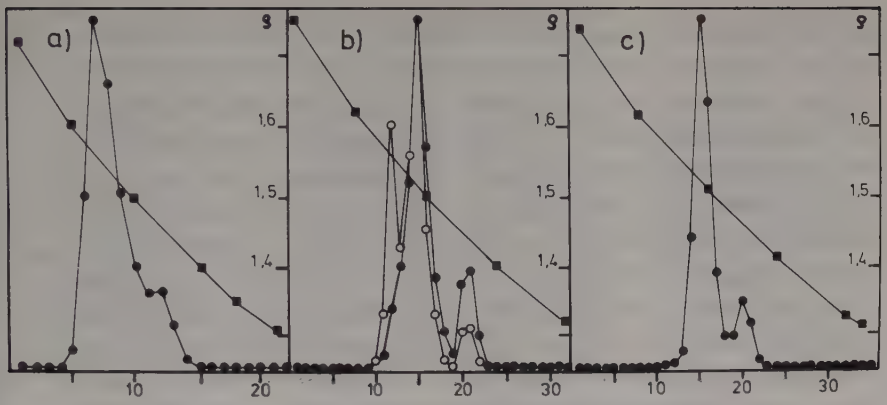


Abb. 4.5 Isopyknische Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten mit Ascites-DNA Satellitabtrennung in Abhängigkeit vom Molekulargewicht (MW der Gipfelfraktion in Sucrosegradienten siehe Abb. 4.6) und Gradientenbeladung (m). Zentrifugationsparameter 2.7.1.; ● 14C-DNA, ○ 3H-DNA. a) Ultraschallfragmente MW= 4 x 10^5 D, m= 490 µg, Abb. 4.6.a. b) Scher mittels Kanülenpassage MW= 2,3 x 10^6 m= 103 µg; Abb. 4.6.b. c) Scher mittels Kanülenpassage, MW= 1,45 x 10^7, m= 390 µg; Abb. 4.6.c.

da die hochrepetitiven Sequenzen in Gruppen (Cluster) mit mehreren µm Länge über das Genom verteilt sind. Der Nachweis, daß es sich bei dem leichten Gipfel auch um Satelliten DNA handelt, wurde anhand seiner hohen Renaturierungsgeschwindigkeit mit HAP-Chromatographie erbracht (4.2.3).

4.2.2. Fragmentierung der DNA und Molekulargewichtsanalysen

Die Fragmentierung der Hauptbanden-DNA vor HAP-Chromatographie erfolgte durch Beschallung oder Scher mittels enger Kanülen.
Die Ultraschallfragmente haben eine mittlere Länge von 500 bis 700 Basenpaaren. Mit solch kleinen Fragmenten lassen sich jedoch fast nur i.r. Sequenzen ohne Loop isolieren, da wie weiter unten gezeigt wird (4.4.2), i.r. Sequenzen mit Loop mindestens 2000 Basenpaare lang sein müssen, um vollständiges Rückfalten zu ermöglichen.

Reproduzierbarer Abbau durch Scher mittels Kanülenpassage ist nur möglich, wenn DNA-Konzentration und Ionenstärke des Puffers konstant gehalten werden und erschöpfend geschert wird (mindestens 10 mal). Um die Entstehung von partiell oder vollständig einsträngigen Scherfragmenten und Einstrangbrüchen zu vermindern, ist ein neutraler pH, hohe Ionenstärke, eine Temperatur nahe $0^{\circ}C$ und Stickstoffbegasung erforderlich (33). Bei niedrigen DNA-Konzentrationen (2 µg/ml, 25 mM PB) können Fragmente mit einem mittleren doppelsträngigen Molekulargewicht von $2,3 \times 10^6$ D erhalten werden. Die Molekulargewichtsverteilungen der Fragmente wurden in isokinetischen neutralen Sucrosegradienten (2.13) und mit einer 14-C markierten λ-Marker DNA bestimmt.

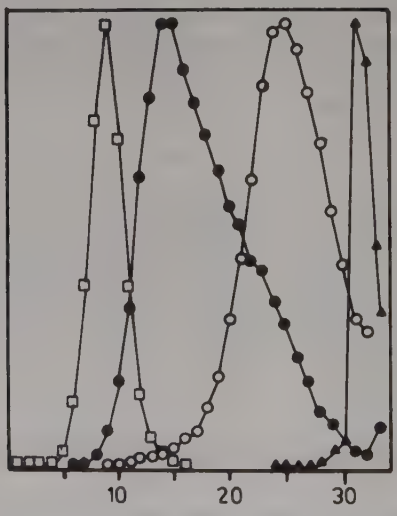


Abb. 4.6 Neutrale SW 40-Sucrosegradienten-Zentrifugation fragmentierter Ascites-DNA. 4 übereinandergezeichnete, im selben Rotor erzeugte Sedimentationsprofile. a) Ultraschallfragmente b) Kanülengescherte DNA (10 x in 20 mM PB, 0,5 mM EDTA, bei 8 µg/ml) c) Kanülengescherte DNA (5 x in 0,4 M NaCl, 10 mM TRIS-HCl, bei 200 µg/ ml) d) λ-Marker DNA. Sedimentationsrichtung von links nach rechts. Peakmolekulargewichte siehe Abb. 4.5.

4.2.3. Hydroxylapatit-Chromatographie

Die fragmentierte doppelsträngige DNA wurde durch die kombinierte Einwirkung von NaOH und Wärme (60°C) denaturiert. Kochen der Nucleinsäure bei 97°C bei einer Salzkonzentration, bei der die Schmelztemperatur der DNA (T_m) unter 87°C liegt, würde zu beträchtlichem thermischen Abbau führen, die alleinige Anwendung der alkalischen Dissoziation löst nach (33) nicht alle Aggregate und Netzwerke. Der T_m - Wert der hier verwendeten Ehrlich-Ascites-DNA ist 84°C (117).

Unter Renaturierung versteht man die Bildung basengepaarter Strukturen zwischen komplementären Strängen, auch innerhalb eines Stranges, wenn ausreichend komplementäre Bereiche in ihm enthalten sind (fold back DNA). Reassoziation ist definiert als die Bildung doppelsträngiger Moleküle aus zwei getrennten Strängen, von denen wenigstens einer frei diffundieren kann. Die Reassoziation ist abhängig von der Salzkonzentration, der Temperatur, der Fragmentgröße und der DNA-Konzentration (33). Für die Isolierung von fold back DNA ist nur eine monomolekulare Renaturierung erwünscht und damit cot-Werte von $\leqslant 10^{-4}$ Mols/l, in meinen Versuchen üblicherweise 36 Sekunden bei einer DNA-Konzentration von 1 µg/ml, oder 72 Sekunden bei der halben Konzentration (Berechnung der cot Werte siehe 2.11.1). Die experimentellen Schwierigkeiten, die mit diesem niedrigen cot-Wert verbunden sind, beruhen einerseits darauf, daß eine Verkürzung der Renaturierungszeit unter 36 Sekunden im präparativen Maßstab kaum möglich ist, andererseits ist eine Senkung der DNA-Konzentration aus folgenden Gründen nicht machbar:

- bei DNA-Konzentrationen unter 1 µg/ml gehen beträchtliche Mengen DNA durch unspezifische Adsorption an Gefäßwände verloren;
- große Volumina sind nicht mehr handhabbar;
- die radioaktive Markierung der eingesetzten DNA kann nicht beliebig gesteigert werden, weil damit auch der radiolytische Abbau zunimmt.

Die Renaturierung erfolgte durch Neutralisierung des Denaturierungsansatzes unter Standard-Temperatur- und Ionenstärke-Bedingungen (2.11). Die Renaturierungsgeschwindigkeit zeigt 25°C unter der Schmelztemperatur ein breites Maximum und läßt sich mit wachsender Ionenstärke des Phosphatpuffers steigern (33). Da polyvalente Kationen zu katalytischem Abbau der Nucleinsäuren führen, enthielten die Denaturierungsansätze 0,1 mM EDTA. Große Probenvolumen (Rechromatographie) enthielten kein EDTA, da HAP von Chelatoren angegriffen wird.

Unmittelbar nach Ablauf der Renaturierungszeit wurde die DNA an HAP chromatographiert oder die Renaturierung durch Zugabe eiskalten Puffers gestoppt.

Hydroxylapatit kann selbst hergestellt werden (118). Alle hier beschriebenen Versuche wurden mit demselben Batch getrockneten HAP durchgeführt, da sich die Bindungseigenschaften von Batch zu Batch infolge von Kristallgrößenunterschieden geringfügig unterscheiden können. Die Kapazität des durch 15 Min. Kochen in Phosphatpuffer (PB) hydratisierten Materials liegt nach Angaben des Herstellers bei ca 200 µg DNA/ml HAP.

Bei niedrigen Phosphatkonzentrationen (10-30 mM PB) werden ein- und doppelsträngige DNA gleichermaßen an HAP gebunden, bei einer Konzentration von 0,12 - 0,14 M PB wird Einstrang-DNA eluiert. Zur vollständigen Elution doppelsträngiger DNA sind hohe Konzentrationen 0,4 - 0,5 M PB erforderlich. Da es mir darauf ankam, nur perfekt renaturierte fold back DNA mit mehr als ca. 50 Basenpaaren zu isolieren, wurden drastische Elutionskriterien gewählt. Nur die Nucleinsäurefraktion, die sich bei 70°C und 0,16 M PB nicht eluieren ließ, gelangte in die fold back Fraktion und zur elektronenmikroskopischen Auswertung.

Bei der Bewertung der bindenden und nichtbindenden Fraktionen stößt man auf zwei Nucleinsäureanteile, die sich irregulär verhalten, die nichtspezifische und die irreversible Bindung. Nichtspezifisch bindende DNA ist einsträngige DNA und erscheint in der doppelsträngigen Elutionsfraktion.

Ihr Anteil schwankt von einem HAP-Batch zum anderen und kann durch Kochen des HAP in 0,1 M PB gering gehalten werden (33). Irreversibel bindende DNA ist jene Fraktion, die sich mit 0,45 M PB bei 70°C nicht eluieren läßt. Die irreversible Bindung nimmt bei niedrigen DNA-Mengen (unter 0,1 µg) zu, ebenso bei Fragmentlängen unter 100 Nucleotiden. Der irreversibel bindende Anteil konnte im allgemeinen bei Hauptbanden DNA unter 1% gehalten werden und wurde wie unter 2.12.4.b beschrieben ermittelt.

Die Trenneigenschaften von HAP bleiben durch Rühren oder Vortexen des Säulenbettes unbeeinflußt. Die Säulenchromatographie erlaubt eine Durchflußrate von bis zu 20 ml/Min. cm^2 (33). Unter Ausnutzung dieser experimentellen Vorteile wurden von mir 3 verschiedene Chromatographiemethoden angewandt, die alle kurze Renaturierungszeiten ermöglichen:

a) Säulenchromatographie mit kontinuierlichen Gradienten
b) Säulenchromatographie mit Stufengradienten
c) Zentrifugationstechnik

zu a:

Die Versuche zur Isolierung von i.r.Sequenzen mit Hydroxylapatit durch Elution von einer Säule mit einem kontinuierlichen Salzgradienten bei Raumtemperatur scheiterten an dem Widerspruch, einerseits ein möglichst geringes Gradientenvolumen anzulegen (20 Säulenvolumina), um die erwünschten Fraktionen nicht zu stark zu verdünnen, andererseits eine hinreichende Trennung der nicht renaturierten und teilweise renaturierten DNA von den perfekt basengepaarten i.r.Sequenzen zu erhalten. Letztere sind bei den beschallten Hauptbandenfragmenten nur mit einem Anteil von 1% der aufgetragenen DNA zu erwarten (siehe 4.4.2). Es zeigte sich, daß mindestens 2 malige Rechromatographie der Schulter zur doppelsträngigen DNA hin erforderlich ist, um ein deutlich zweigipfliges Elutionsprofil zu erhalten (Abb. 4.7).

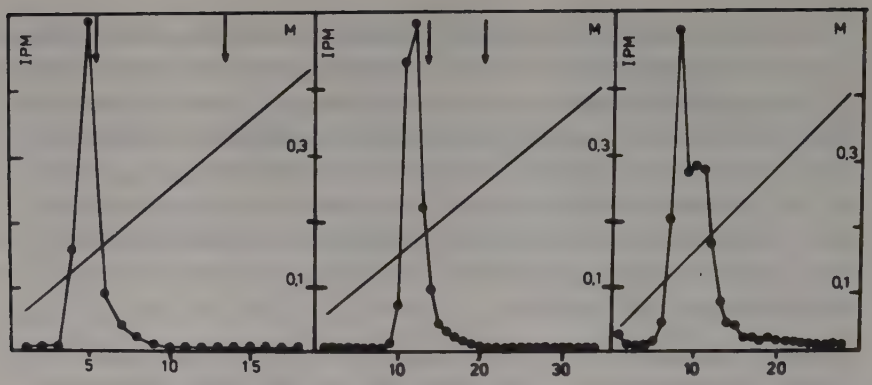


Abb. 4.7 HAP-Säulenchromatographie mit Ultraschallfragmenten von Hauptbanden DNA (Länge 750 Nucleotide); Chromatographieparameter (2.11); a) Fraktionen 6 bis 13 (Pfeile) werden gepoolt, verdünnt und in b) rechromatographiert. c) Rechromatographie von Fr. 14-20 von b. Die Gipfelfraktionen repräsentieren jeweils a)50.840 b)5280 c)1906 IPM.

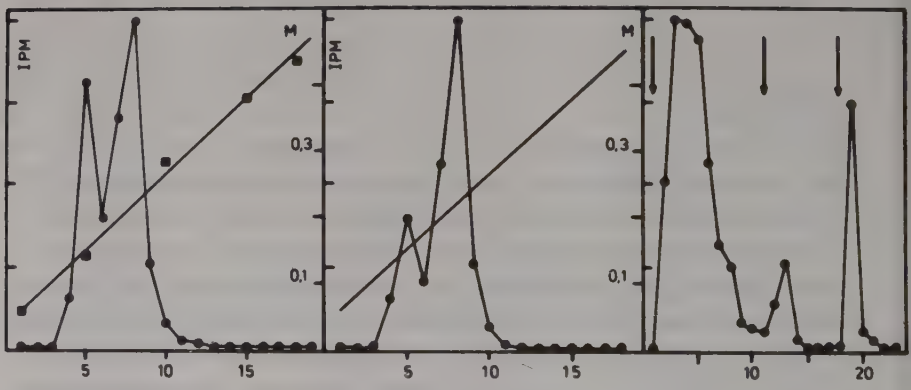


Abb. 4.8 HAP-Säulenchromatographie mit Ultraschallfragmenten von Hauptbanden DNA; Chromatographieparameter (2.11). a) Gemisch nativer und denaturierter Ascites DNA; Elutionsgipfel für einsträngige DNA 0,15 M PB, ds-DNA 0,21 M PB. b) bei einem cot-Wert von $1{,}3 \times 10^{-3}$ Mols/l renaturierte Satellit-DNA. c) Elutionsprofil eines Stufengradienten, Pfeile bedeuten von links nach rechts: 120 mM PB, 60°C; 160 mM PB, 70°C; 450 mM PB, 70°C.

Selbst die Trennung eines Gemisches von einsträngiger und doppelsträngiger DNA ergibt bei einem Gradientenvolumen von 20 Säulenvolumina keine vollständig getrennten Gipfel (Abb. 4.8 a). Andererseits konnte durch Säulenchromatographie einer mit einem cot von $1,3 \times 10^{-3}$ Mols/l renaturierten Satelliten DNA die Wirksamkeit der Ag^{+}/Cs_2SO_4 -Zentrifugation gezeigt werden (Abb. 4.8.b).

zu b:
Die Elutionsbedingungen wurden so modifiziert, daß der fold back Elutionsgipfel reproduzierbar immer bei den gleichen Bedingungen, (Temperatur und Ionenstärke) denselben Prozentsatz der Hauptbanden DNA repräsentiert. Dazu wurde die bei 0,12 M PB und 60°C aufgetragene DNA reichlich mit Auftragspuffer nachgewaschen, mangelhaft zurückgefaltete DNA bei 70°C und 0,16 M PB abgelöst und die interessierende fold back DNA bei noch drastischeren Bedingungen (70°C und 0,45 M PB) eluiert (Abb. 4.8 c). Diese Methode war geeignet, fold back DNA konzentriert in 1 - 2 Säulenvolumen für die elektronenmikroskopische Auswertung zu gewinnen.
Die irreversible Bindung wurde bei allen Säulen mit 0,5 - 1,5% ermittelt. Der Anteil der fold back DNA in Prozent der aufgetragenen Hauptbanden-DNA war von der Fragmentgröße abhängig:

	fold back DNA (% der aufgetragenen IPM)	
Fragmentlänge	1. HAP-Chromat.	2. HAP-Chromat.
0,15 µm (beschallt)	1%	50%
2,00 µm (geschert)	9%	27%

Die Bindungswerte der zweiten HAP-Chromatographie beziehen sich auf die Rechromatographie erneut de- und renaturierter fold back Fraktionen der ersten HAP-Chromatographie. Die Zunahme der fold back Fraktion bei größeren Fragmentlängen wurde auch bei anderen Autoren beobachtet (19,103) und damit erklärt, daß bei größeren Fragmentlängen auch i.r.Sequenzpaare mit Loop isoliert werden können.

Theoretisch sollte man erwarten, daß bei erneuter Denaturierung der fold back DNA, Renaturierung und Chromatographie nahezu 100% als fold back DNA eluierbar sind. Dies trifft um so weniger zu, je länger die rechromatographierten Fragmente sind. Zur Erklärung kommen 2 Möglichkeiten in Frage: entweder enthält die fold back Fraktion noch bimolekular reassoziierte Moleküle oder die fold back Eigenschaft der DNA geht durch Verminderung der Fragmentlänge (thermischer Abbau) verloren, z.B. durch einen Einstrangbruch im Loop. Diese beiden Möglichkeiten wurden nicht weiter untersucht, sind jedoch auch von anderen Autoren beobachtet worden (19.103): bei einer Fragmentlänge von 3,3 µm enthielt die fold back-Fraktion der ersten HAP-Chromatographie 14% Hauptbanden DNA, die zweite HAP-Chromatographie davon nur noch 32% (103).

Zur Rechromatographie von fold back DNA ist es notwendig, nichtradioaktive Carrier-DNA zuzusetzen, da sonst bei Konzentrationen unter 1 µg DNA/ml gearbeitet werden müßte, was zu starken Verlusten der DNA durch Adsorption und irreversible Bindung führt. Diese DNA sollte möglichst wenig homologe Sequenzen zur Ascites-DNA aufweisen, um bimolekulare Renaturierungsprodukte auszuschließen. Kalbsthymus-DNA beeinflußte in 10-fachem Überschuß bei cot-Werten von 10^{-4} Mol·s/l die fold back Bindung nicht meßbar.

zu c:

Diese Technik wurde ausschließlich bei den Markierungsexperimenten in Teil 4.3 angewandt. Der Anteil der irreversibel bindenden DNA liegt mit 1,3% scheinbar etwas höher als bei der Säulenchromatographie, da 4% der auf einer bestimmten Stufe eluierten DNA in den darauffolgenden Elutionsschritt verschleppt wird. Dieser Fehler ist praktisch vernachlässigbar für die fold back Fraktion. Sie ist mit 0,14% der Gesamt-DNA aus dem 0,16 M PB-Sediment kontaminiert und 0,34% gehen zugunsten der "irreversibel"-bindenden Fraktion verloren (Tab. 4.3).

Tab. 4.3 Mittelwerte aus 33 HAP-Chromatographien nach der Zentrifugentechnik (2.11.3) mit Ascites Hauptbanden DNA aus 6 voneinander unabhängigen Pulsmarkierungsexperimenten (% ZPM vom Auftrag)

Fraktion	T	Puffer	$\bar{x}$	σ
Nichtbindender Überstand	60°C	0,12 M PB	75,7%	4,3
Nachwaschung	60°C	0,12 M PB	11,2%	2,8
Elution	70°C	0,16 M PB	3,5%	1,1
fold back Fraktion	70°C	0,45 M PB	8,6%	3,1
irreversibel bindend			1,3%	0,7

4.2.4. Vorbereitung der fold back DNA zur Elektronenmikroskopie

Die über HAP-Chromatographie angereicherte fold back DNA befindet sich in 0,45 M PB und muß vor einer elektronenmikroskopischen Analyse zunächst ausgiebig dialysiert werden. Obwohl diese Dialyse bei 4°C und einer DNA-Konzentration von 1 - 2 µg/ml durchgeführt wurde, zeigten die ersten elektronenmikroskopischen Präparate, daß die einsträngigen DNA-Abschnitte stark reassoziiert waren und reichlich multimolekulare Netzwerke enthielten . Diese Netzwerke sind mit großer Wahrscheinlichkeit erst nach der Elution vom HAP während der langen Dialysezeit entstanden.

Außerdem enthielten diese Spreitungen einen Anteil von ca. 20% bimolekularen Reassoziaten. Beide entstammen vermutlich den repetetiven DNA-Sequenzen. Um eine statistische Übersicht über die "echten' i.r.Sequenzen in der fold back Fraktion zu gewinnen, war eine erneute De- und Renaturierung im Spreitungsansatz (Isodenaturierung) bei einem kontrollierten cot von 10^{-4} Mols/l erforderlich.

In der Literatur sind Isodenaturierungstechniken in Gegenwart von NaOH (103), Formamid (46) und durch Hitzeeinwirkung (84) beschrieben. Alle 3 Methoden wurden experimentell durchgeführt und miteinander verglichen. Die Formamiddenaturierung ist von allen die schonendste und kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden (119-121). 1% Formamid senkt die Schmelz-

temperatur der DNA um 0,72°C. Diese Methode ist hervorragend dazu geeignet, lange Renaturierungszeiten zu verkürzen, aber bei den hier geforderten niedrigen cot-Werten nur schwer steuerbar.
Sowohl bei einer Denaturierung mit Formamid als auch mit NaOH sind hohe DNA-Konzentrationen in der zu untersuchenden Lösung erforderlich, da das denaturierende Agens zur Renaturierung wieder herausverdünnt werden muß und damit die DNA Konzentration der Spreitungslösung abnimmt. Aus diesen Gründen erwies sich die Hitzedenaturierung am praktikabelsten und liegt den in Abschnitt 4.4 berichteten Ergebnissen zugrunde. Thermischer Abbau und Depurinierung der einsträngigen DNA konnten durch Denaturierung in stark gepufferten Ansätzen und Minimierung der Denaturierungszeit gering gehalten werden.

Alle DNA-Präparationen (Spreitungen) wurden nach einer von Kleinschmidt (73) entwickelten basischen Proteinfilmtechnik hergestellt. Zur guten Unterscheidbarkeit ein- und doppelsträngiger DNA im Elektronenmikroskop hat sich die Gegenwart von Formamid gegenüber rein wässrigen Spreitungsmethoden als überlegen herausgestellt (46). Bei einer Konzentration von 50% Formamid im Spreitungsansatz verhindert es unspezifische Basenwechselwirkungen der einsträngigen DNA und ihr büschelförmiges Zusammenfallen. Doppelsträngige DNA wird unter diesen Bedingungen nicht aufgeschmolzen (23°C unter der Schmelztemperatur), erscheint etwas dicker (80 - 150 Å) und weniger "kinky"[1] als einsträngige DNA (46). Unter diesen Bedingungen sind Längenmessungen der Einstrang- und Doppelstrang-DNA möglich. Im Gegensatz zu den meisten denaturierenden Agentien steigert Formamid den Kontrast. Es muß auch in der Hypophase vorhanden sein. Der gespreitete Film ist nur kurze Zeit stabil, da Formamid zur Hydrolyse neigt, wobei Ammoniak aus den Lösungen entweicht und der pH fällt. Bei einem pH unter 7 beginnt Depurinierung, unter 6 erfolgt starke Aggregation, über 10 Aggregation und Kontrastverminderung. Hohe Ionenstärken und Spuren von Detergentien führen ebenfalls zur Aggregation. Die Cytochromkonzentration im Spreitungsansatz sollte

1) häufig abgeknickte Kontur (engl. kinky)

50 µg/ml nicht überschreiten, da höhere Konzentrationen rosettenförmige Aggregationen fördern und der Kontrast, insbesondere die Unterscheidbarkeit zwischen ein- und doppelsträngiger DNA abnimmt.
Wird die nach der Formamidtechnik gespreitete DNA nur mit Uranylacetat gefärbt, so bleibt der Kontrast so flau, daß man die Nucleinsäurestränge nur durch Dunkelfeldmikroskopie erkennen kann. Deshalb wurde prinzipiell eine Palladium-Schrägbedampfung angeschlossen.

4.3. Radioaktive Markierung von inverted repeat Sequenzen

4.3.1. Vorbemerkungen

Den nachfolgenden Experimenten liegen folgende 2 Hypothesen zugrunde:

1. Die Initiationsregion ist durch das Vorkommen von i.r. Sequenzen gekennzeichnet.
2. Auf frisch replizierter DNA enthält die Initiationsregion zumindest für eine gewisse Zeit nach dem Initiationsvorgang Bindungsstellen für Nitrocellulose (NC).

Es wurden zwei verschiedene DNA-Markierungsverfahren angewandt:

a) Puls-Chase Markierung

Das Prinzip dieser Markierung wurde bereits in der Einleitung (Abb. 1.2) beschrieben.
Für Initiationsstrukturen war bislang nicht bekannt, wie lange sie ihre nitrocellulose-bindende Eigenschaft bewahren, ob sie also wie Terminationsstrukturen während der Pulszeit auflaufen oder ihre Radioaktivität wie die von laufenden Replikationsgabeln "chasebar" ist. Geht man von der Hypothese aus, daß es sich bei i.r.Sequenzen um "spezifische Markersequenzen" für Initiationsstellen handelt, so sind aus ihrer Zu- oder Abnahme in der nitrocellulosebindenden Fraktion der

Puls-Chase markierten DNA gegenüber der Puls-DNA Hinweise auf die zeitliche Stabilität der Nitrocellulosebindung der Initiationsstellen zu erwarten. Jede systematische Anreicherung in einer der 4 Nitrocellulosefraktionen läßt zumindest die Schlußfolgerung zu, daß i.r.Sequenzen nicht stochastisch repliziert werden, sondern daß sie in einem funktionellen Zusammenhang zur Replikation stehen.
Die Pulsdauer betrug 20 Min, um eine ausreichend große Zahl startender Replikons zu erfassen und über die maximal mögliche Fragmentlänge hinweg zu markieren (0,6 /um/Min. x 20 Min. = 12 /um). Die Chasedauer betrug ebenfalls 20 Min, um sicher zu gehen, daß sich alle laufenden und damit bindenden Gabeln weit genug von den radioaktiv markierten Initiationsstellen entfernt haben.

b) Markierung nach Aufhebung eines Blocks der Initiation

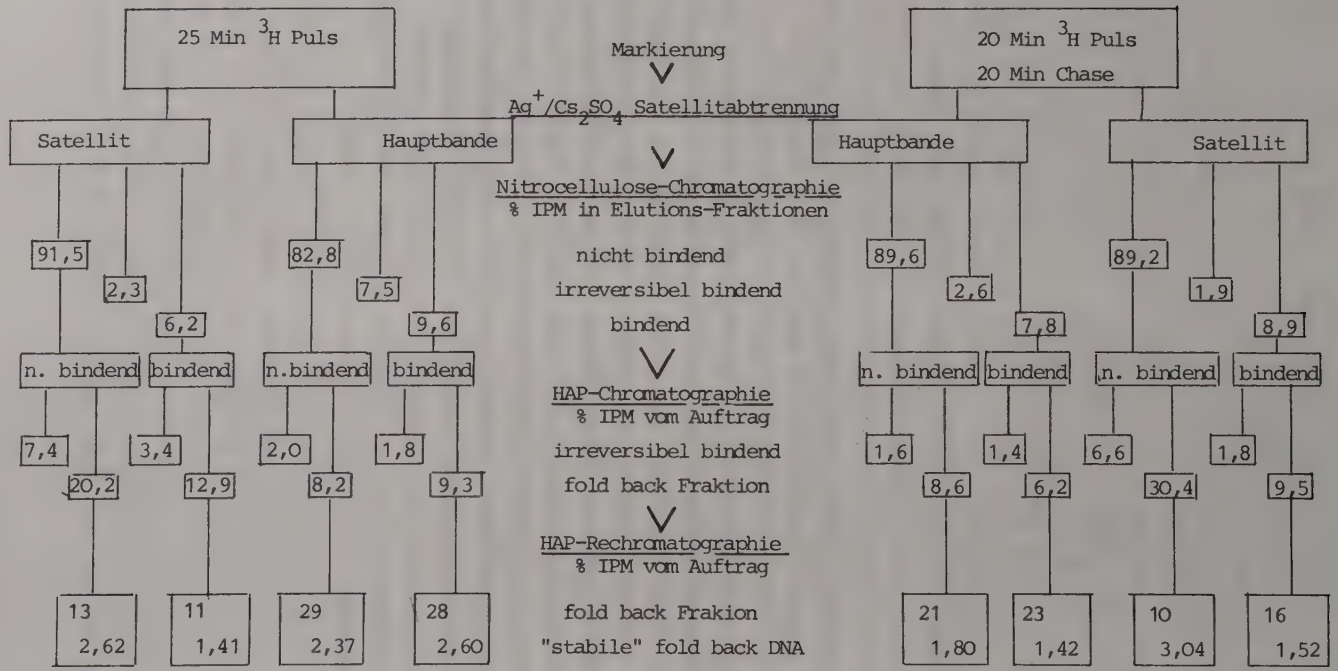
Nach Probst und Gekeler (122) ist die Replikon-Initiation in Ascites-Zellen durch O_2-Entzug hemmbar. Stellt man nach ca.7 h Anaerobie wieder einen normalen Sauerstoffpartialdruck im Medium her und bietet radioaktive DNA-Vorstufen an, so werden überwiegend frisch initiierte Replikons markiert.
Da zum Zeitpunkt meiner Experimente noch keine präzisen Angaben über den günstigsten Zeitpunkt einer Pulsmarkierung nach Aufhebung der Anaerobie vorlagen, führte ich 5 Min. Pulsmarkierungen mit hoher spezifischer Aktivität zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Wiederbelüftung durch.

4.3.2. Puls - Chase Markierungen

Die beiden Puls- und Puls/Chase-Experimente sind mit allen wesentlichen experimentellen Schritten und den Versuchsergebnissen in Tab. 4.4 (Expt. 4.4) und Tab. 4.5 (Expt. 4.5) zusammengestellt. In Expt. 4.4 wird lediglich die Verteilung der beiden Markierungen (^{3}H-Puls und ^{3}H-Puls/Chase) auf die diversen während der Satellitabtrennung, Nitrocellulosechromatographie und HAP-Chromatographie erhaltenen Fraktionen bilanziert. In Expt. 4.5 wird eine mit ^{14}C für mehr als eine Zellgeneration markierte DNA vor der Fraktionierung zugemischt. Die Ergebnisse werden dann in Form der ^{3}H/^{14}C-Quotienten präsentiert.
Zu den Tabellen seien noch folgende Anmerkungen gemacht: Das Zumischen der ^{14}C-DNA erfolgte auf der Stufe (Expt 4.5) der gereinigten Nucleinsäuren vor ihrer Fragmentierung, da die sichere Bestimmung der spezifischen Aktivität der ^{3}H-DNA erst auf dieser Reinheitsstufe möglich war. Tabelle 4.5 enthält ^{3}H/^{14}C IPM und ZPM Quotienten. Die IPM-Quotienten sind sind aufgrund der unterschiedlichen Zählausbeuten der beiden Isotope in verschiedenen Zählsystemen (2.12.4) nur innerhalb einer Zeile miteinander vergleichbar. Sie sind auf eine mittlere Kreuzkontamination und einen mittleren Hintergrund korrigiert. Die ZPM-Quotienten der HAP-Chromatographie-Fraktionen sind zusätzlich auf ihre tatsächliche Zählausbeute und Kreuzkontamination durch Auflösen der Proben und interne Standardisierung mit ^{14}C-und ^{3}H-Toluol korrigiert. Dieses flüssige Zählsystem hatte sich gegenüber der Probenverbrennung, der externen Standardisierung und der Filterauflösung (2.12.4.c) als das mit der geringsten Standardabweichung für die ^{3}H/^{14}C-Quotienten erwiesen.

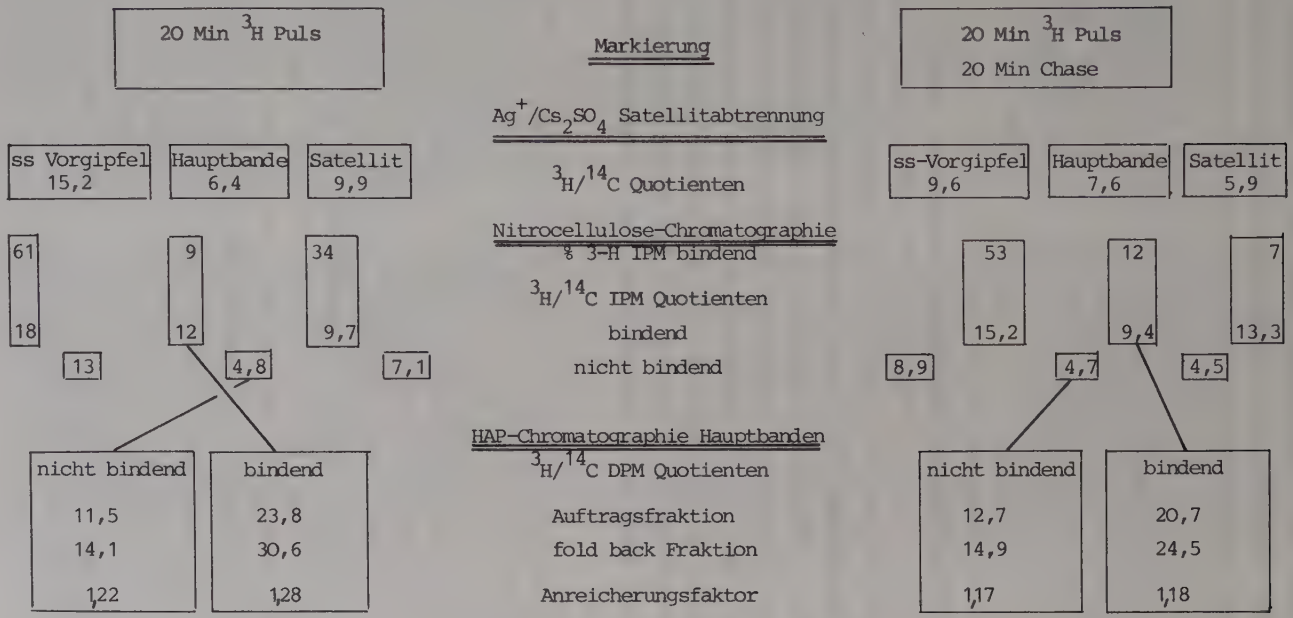
Anfänglich war erwartet worden, daß sich ^{14}C-DNA und pulsmarkierte ^{3}H-DNA im Ag^{+}/Cs_2SO_4-Gradienten jeweils nur in Hauptbande und Satellit aufspalten. Tatsächlich aber enthält die pulsmarkierte DNA in der Umgebung ihrer Markierung einsträngige Anteile, die mehr Silber binden als die Hauptbande und zur Ausbildung eines eigenen Gipfels führen (ss-Vorgipfel). Daß es sich bei dem "ss-Vorgipfel" um frisch repli-

Tab. 4.4 Vergleich nitrocellulosebindender Puls und Puls/Chase fold back DNA



Ergänzende Angaben: Markierung erfolgte mit 3H TdR bei 5 uCi/ml, Zellkonzentration 3,5 x 10^6 Zellen/ml; Reinigung der DNA erfolgte nach (2.4.1),(2.4.2),(2.4.3),(2.4.5). Spezifische Aktivität der Puls DNA 33.300 IPM/ug DNA; der Puls/Chase DNA 28.500 IPM/ug DNA. DNA-Konzentration bei der Kryolyse bei beiden DNAs 80 ug/ml.

Tab. 4.5 Vergleich nitrocellulosebindender Puls und Puls/Chase fold back DNA mit interner ^{14}C DNA



Ergänzende Angaben: Markierung erfolgte mit 3H-Tdr bei 5 uCi/ml; Zellkonzentration pro ml Medium, 5 x 10^6; Reinigung der DNA erfolgte nach (2.4.2),(2.4.3), (2.4.5). Spezifische Aktivität der Puls DNA 28.000 IPM/ug der Puls/Chase DNA 30.000 IPM / ug, der 14C DNA 7.000 IPM/ ug. DNA-Konzentration bei der Kryolyse: Puls DNA 98 ug/ml Puls/Chase DNA 83 ug/ml.

zierte DNA handelt, wird durch den erhöhten $^{3}H/^{14}C$ Quotienten belegt (Expt. 4.5). Vorgipfel, Hauptbande und Satellit wurden in Expt. 4.5 getrennt und der nachfolgenden Nitrocellulose-Chromatographie und HAP-Chromatographie unterworfen.

Die NC-Chromatographie ergab folgendes Bild: In beiden Experimenten enthält erwartungsgemäß die Puls-DNA mehr Bindungspunkte in der Umgebung der Markierung als die Puls/Chase-DNA. Am stärksten bindend mit über 50% ist der ss-Vorgipfel der Ag^{+}/Cs_2SO_4-Gradienten (Expt. 4.5). Damit wird nochmals mit NC-Chromatographie gezeigt, daß es sich bei diesem Vorgipfel um teilweise einsträngige DNA handelt.
Nach der NC-Chromatographie dieses ss-Vorgipfels enthält die bindende Fraktion praktisch keine ^{14}C-DNA mehr, und es ist nicht mehr möglich vernünftige $^{3}H/^{14}C$-Quotienten zu bilden. Aus diesem Grund müssen die Daten zur HAP-Chromatographie dieser Fraktionen wegfallen (Expt. 4.5). Eine nachträgliche Zumischung von ^{14}C langzeitmarkierter DNA verbietet sich, da die ^{3}H-DNA- und ^{14}C-DNA-Fragmente die gleiche Molekulargewichtsverteilung aufweisen sollten. Der hohe Anteil "irreversibel" bindender Puls-DNA von 7,5% der aufgetragenen IPM in Expt 4.4 wird durch ein zu klein gewähltes Elutionsvolumen erklärt.

Die HAP-Chromatographie zeigt für den ss-Vorgipfel (Expt. 4.5) und die Hauptbande einen Anteil von maximal 2% irreversibel bindender DNA. Die Satellit-DNA bildet eine Ausnahme. Sie enthält tandemförmig angeordnete hochrepetitive Sequenzen, die mit extrem niedrigen cot-Werten bimolekulare Reassoziationsprodukte bilden. Diese Netzwerke sind der Grund für eine "irreversible" Bindung mit teilweise über 7% der aufgetragenen ZPM. Daß die als Satellit-fold back-Fraktion isolierte DNA jedoch weniger stabile i.r.Sequenzen enthält als die entsprechende Hauptbanden DNA,beweist die Rechromatographie (Expt. 4.4). Zur Rechromatographie werden die fold back Fraktionen der ersten HAP-Chromatographie erneut denaturiert und in Gegenwart von kalter Kalbsthymus-Carrier-DNA erneut renaturiert und an HAP fraktioniert. Der Anteil der über 2 Denaturierungen "stabilen" fold back-DNA in Prozent der zur ersten HAP-Chromatographie aufgetragenen DPM liegt in keiner

Fraktion über 3% (Tab. 4.4).

Die in Tab. 4.5 genannten Anreicherungsfaktoren nach der HAP-Chromatographie wurden ermittelt durch Division des $^{3}H/^{14}C$-Quotienten der fold back Fraktion durch den entsprechenden Quotienten der Auftragsfraktion. Sie repräsentieren relative Veränderungen der ^{3}H-markierten fold back DNA gegenüber den fold back Sequenzen der allgemeinen Zell-DNA. Die Anreicherungsfaktoren der an NC nicht bindenden fold back Fraktionen (Expt. 4.5) wurden in 2 voneinander unabhängigen HAP-Chromatographien auf 3 Dezimalstellen genau reproduziert.

Die Ergebnisse der beiden Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Tatsächlich nimmt in Experiment 4.4 die bindende Radioaktivität der Puls-Hauptbanden-DNA von 17,1% (bindend 9,6%, irreversibel bindend 7,5%) auf 10,4% in der Puls/Chase-Hauptbanden-DNA ab. Von diesen Fraktionen sind wiederum 9,3% bzw 6,2% fold back DNA und damit potentielle Initiationsstrukturen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Radioaktivität der Initiationsstrukturen ähnlich chasebar ist wie die von laufenden Gabeln. Eine zeitliche Stabilität von Bindungsstellen in Initiationsstrukturen über Stunden hinweg ähnlich denen der Terminationsstrukturen ist somit unwahrscheinlich, wenn ein signifikanter Teil der Puls-markierten fold back DNA Initiationsstellen repräsentiert. In Expt. 4.5 werden die Initiationsstrukturen in der an NC-bindenden Puls-und Puls/Chase-Fraktionen auf die allgemeine Zell-DNA in Form der ^{14}C-Referenz bezogen. Auch hier findet man eine Abnahme der Anreicherungsfaktoren von 1,28 in der an NC bindenden Puls-Hauptbanden-DNA auf 1,18 in der entsprechenden Puls/Chase-DNA-Fraktion.
Die Ergebnisse beider Versuche sind somit konsistent. Eine funktionelle Beteiligung von i.r.Sequenzen an der Replikation kann nach der systematischen Anreicherung von fold back Sequenzen in der NC-bindenden Puls DNA Fraktion als wahrscheinlich angesehen werden. Quantitative Aussagen über die zeitliche Stabilität der Initiationsstrukturen sind aber nicht möglich, da ihr relativer Anteil an der NC-bindenden Fraktion nicht bekannt ist.

4.3.3. "Spezifische" Markierung der Initiationsregion

3 vollständig voneinander unabhängige Versuchsreihen mit Puls-Markierung nach Anaerobie sind in Tab. 4.6 zusammengestellt (Expt. A, B,C). Die einzelnen Experimente sind durch senkrechte Doppelstriche getrennt, die Daten nicht ohne weiteres untereinander vergleichbar.

Beim Experiment A (Spalte 1 und 2) erfolgte die Zugabe der Radioaktivität noch unter anaeroben Bedingungen. Die Zellen wurden 2 Min. zur Auffüllung der intracellulären Pools anaerob belassen, und danach durch Zugabe von 1/5 Vol O_2 gesättigten Mediums auf atmosphärischen pO_2 gebracht. Offensichtlich wurden in den darauffolgenden 5 Min. Pulszeit jedoch nur sehr wenig laufende und neu initiierende Replikons markiert, da die spezifische Aktivität der DNA im Gegensatz zu den anderen Experimenten mit 240 IPM/$_{/}$ug DNA extrem niedrig ist. Als Konsequenz dieses Ergebnisses wurden bei den darauffolgenden Experimenten verschieden lange Wartezeiten nach Wiederbelüftung eingeführt. Der Ag^+/Cs_2SO_4-Gradient zur Satellitabtrennung ist in Abb. 4.5b wiedergegeben und zeigt einen deutlichen ^3H-Vorgipfel. Der Satellit enthält wieder relativ viel "Pseudo fold back DNA". Beide Phänomene wurden bereits diskutiert.

Beim Experiment B (Spalte 3 - 5 in Tab 4.6) erfolgte die Pulsmarkierung 8 Min. nach Herstellung eines normalen O_2-Partialdruckes im Medium. Die ^3H-Puls-DNA zeigt im Gegensatz zur zugemischten ^{14}C-langzeitmarkierten DNA einen deutlichen Vorgipfel von 17% der gesamten ^3H IPM im Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten (Abb. 4.4c). Er wird getrennt von Haupt- und Satellitenbande der HAP-Chromatographie unterworfen. Die erste HAP-Chromatographie wurde nach der für die davorliegenden Schritte minimal notwendigen Dauer von 20 Tagen durchgeführt. Ein Aliquot der Hauptbanden-DNA bringt eine Anreicherung der ^3H-Puls-fold back Sequenzen gegenüber den ^{14}C-fold back Sequenzen (100%) auf 134%. Der Rest der Hauptbande, der ^3H-Vorgipfel (ss Bande) und die Satellit-DNA wurden eingefroren und nach 21 Tagen unter den gleichen Bedingungen einer HAP-Chromato-

Tab. 4.6 a Fold back DNA Anreicherung aus "spezifisch in der Initiationsregion 5 Min Pulsmarkierter DNA

Experiment	A		B			C			
Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Markierungs-Schema									
Anaerobie Dauer	8 h			8 h		130 Min	7 h	7 h	7 h
Wiederbelüfungszeit[1]	0 Min			8 Min		Anaerob	10 Min	23 Min	180 Min
spez. Aktivität IPM/µg	240			24.000		10.750	24.000	9.000	6.000
Ag^+/Cs_2SO_4 Satellit-Abtrennung									
	Hauptb.	Sat.-B.	ss-Bande	Hauptb.	Sat.-B.	Hauptbanden			
% ^3H IPM pro Bande			17,4	69	13,6				
$^3H/^{14}C$ IPM Quotient			9,4	1,5	1,02				
HAP - CHROMATOGRAPHIE									
$^3H/^{14}C$ DPM Quotienten:									
Auftragsfraktion	0,65			4,1		10,4	9,4	9,8	9,2
fold back Fraktion	0,25			5,5		11,4	12,8	10,4	11,1
Anreicherungsfaktor	0,38			1,34		1,09	1,36	1,06	1,18
^3H-fold back Fraktion in% der aufgetragenen 3-H IPM	6	55		11		8	8	5	7

[1] bis zum Beginn der Markierung

Tab 4.6 b Fold back DNA Anreicherung aus "spezifisch" in der Initiationsregion 5 Min Pulsmarkierter DNA

Experiment	(A)			(B)			(C)		
Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Hauptb.	Sat.-B.	ss-Bande	Hauptb.	Sat.-B.	Hauptb.	Hauptb.	Hauptb.	Hauptb.
HAP - Rechromatographie									
3-H/14-C DPM Quotienten									
Auftragsfraktion	0,25			5,5		17,1	12,3	10,4	13
fold back fraktion	0,36			12,5		18,1	15,6	22,2	14,4
Anreicherungsfaktor									
	1,44			2,27		1,05	1,26	2,13	1,10
^3H fold back Fraktion (in % der aufgetragenen ^3H IPM)									
	14	8		35		22	27	14	37
% "stabile" fold back DNA (nach zweimaliger Chromatographie)									
	0,84	4,4		3,8		1,76	2,16	0,7	2,5

HAP Chromatographie nach 21 Tagen			
3-H/14-C DPM Quotient			
Auftragsfraktion	25,1	3,9	2,5
fold back fraktion	5,7	3,9	2,9
Anreicherungsfaktor			
	4,22	1,00	1,16

Tab. 4.6 Ergänzende Angaben zur DNA-Markierung und Aufarbeitung für die Experimente A, B und C: Die Zellkonzentration pro ml Medium während der Pulsmarkierung betrug in Mio: A 12, B 10, C 6,6; Die Radioaktivität betrug bei allen Experimenten 70 uCi/ml; Die DNA-Aufarbeitung bei Experiment A und B erfolgte nach 2.4.2., 2.4.3., 2.4.5.; in Experiment C nach 2.4.2., 2.4.4,, 2.4.5.; Die spezifische Aktivität der zugemischten 14-C DNA in IPM/ug DNA betrug bei A 8000, B 7400, C 6700.

graphie unterzogen. Dabei ging der Anreicherungsfaktor auf 100% zurück. Die Ursache für diese zeitabhängige Abnahme der ^{3}H-pulsmarkierten fold back Sequenzen gegenüber den ^{14}C-fold back Sequenzen muß in der Radiolyse dieser hochspezifisch markierten DNA zu suchen sein. Bei der Radiolyse entstehen Einstrangbrüche, die nach Denaturierung ein geringeres mittleres Molekulargewicht der ^{3}H-DNA ergeben als für die nicht-radiolysierte ^{14}C-DNA. Der Einfluß der Fragmentgröße auf den mit der HAP-Technik erfaßten fold back-Anteil wurde bereits diskutiert.

Wenn man die spezifische Aktivität des eingesetzten (Methyl-3 H)-Thymidins mit 79.400 Ci/Mol zugrundelegt, gelangt man zu 0,0004 Zerfällen pro Tag und pro substituiertem Thymin. Geht man davon aus, daß jede vierte Base ein Thymin ist, und nur jedes fünfte Thymin substituiert wird, so kann man nach 3 Wochen nach durchschnittlich 2380 Basen oder 0,8 um einen Strangbruch erwarten. Die mittlere Fragmentlänge, die man durch Kanülenscher in der zugemischten ^{14}C-DNA erzielt ist jedoch 2 um, was eine erheblich größere Wahrscheinlichkeit zur Isolierung eines i.r.Sequenzpaares beinhaltet. Nach einer persönlichen Mitteilung von E. Helftenbein kann der Substitutionsgrad unter O_2Entzug markierter DNA sogar erheblich höher als 0,2 werden. Der Einfluß der Radiolyse auf die Fragmentlängenverteilung wurde deshalb in Expt. C (Spalte 6-9) näher untersucht.

In Experiment C wurde eine Pulsmarkierung nach 130 Min O_2 -

Deprivation unter anaeroben Bedingungen gesetzt und in drei weiteren Kulturen Pulse nach 10 Min, 23 Min. und 180 Min. Wiederbelüftung. Für die letzte Markierung (180 Min. nach Wiederbelüftung) wurden die Zellen in konditioniertes Medium überführt (2.3.3), um eine Minderung der Einbaurate durch Erschöpfen des Mediums zu verhindern.
Die spezifische Aktivität der Puls-DNA 10 Min. nach Aufhebung der Anaerobie ist mit dem Wert in Experiment B gut vergleichbar. Die fallenden Einbauraten, sichtbar an der geringen spezifischen Aktivität 23 Min. und 180 Min. nach Wiederbelüftung können durch eine Schädigung der Zellen erklärt weren. In diesen beiden Kulturen wurde zur Aufhebung der Anaerobie 15 Min. lang Luft mit einer Membranpumpe in das Medium eingeblasen, was zu geringem Schäumen und möglicherweise Zellmembranschädigung geführt hat.

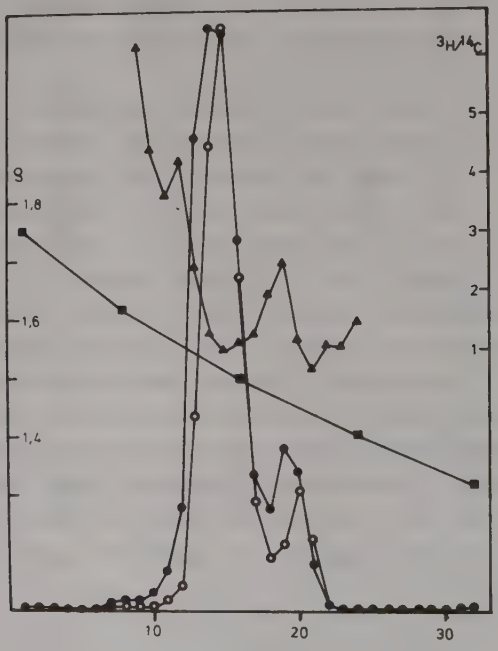


Abb. 4.9 Ag^{+}/Cs_2SO_4-Gradient zur Satellitabtrennung nach (2.7.1.). Betrifft Experiment C; 5 Min. Pulsmarkierung 10 Min. nach Wiederbelüftung; ● 3H-DNA, ○ 14C-DNA.

Die Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten zur Satellitabtrennung zeigen in diesem Experiment (C) keinen ^3H-Puls-Vorgipfel, aber eine flache Schulter und eine Bandenverbreiterung zur größeren Dichte hin gegenüber der internen ^{14}C-DNA. Dies wird besonders deutlich, wenn man die $^3H/^{14}C$-Quotienten für jede Fraktion des Gradienten ermittelt (Abb. 4.9). Eine mögliche Ursache für die schwache Ausprägung des ^3H-Vorgipfels war die in dieser Aufarbeitung äußerst schonende DNA-Aufarbeitung, die im Gegensatz zu vorherigen Experimenten weniger neusynthetisierte DNA (Okazaki-Stücke) vom Parentalstrang ablöste.

Um den Einfluß der Radiolyse zu untersuchen, wurde 16 Tage nach Pulsmarkierung von den dialysierten Hauptbanden der Ag^+/Cs_2SO_4-Gradienten eine Molekulargewichtsanalyse mit neutralen und alkalischen Sucrosegradienten durchgeführt. Die neutralen Gipfelmolekulargewichte der Hauptbanden-DNA betrugen (Tab. 4.6, Expt. C, Spalte 8) für

^3H-DNA $4{,}3 \times 10^6$ D , ^{14}C-DNA $12{,}2 \times 10^6$ D ,

nach erschöpfendem Scher (2.8.2), wie er unmittelbar vor jeder HAP-Chromatographie durchgeführt wird,

^3H-DNA $2{,}5 \times 10^6$ D , ^{14}C-DNA $3{,}7 \times 10^6$ D.

Dieselbe DNA hatte in alkalischen Sucrosegradienten Gipfelmolekulargewichte der einsträngigen Fragmente :

^3H-DNA $0{,}86 \times 10^6$ D , ^{14}C-DNA $1{,}36 \times 10^6$ D.

Dies bedeutet, daß sich schon nach 16 Tagen die für die fold back Renaturierung ausschlaggebenden Einstrangfragmentlängen von ^{14}C-DNA zu ^3H-DNA wie 1,6 zu 1 unterscheiden.

Die entsprechende Hauptbanden-DNA aus dem Anaerobieexperiment B (Tab. 4.6, Spalte 4) mit einer spezifischen Aktivität von 24000 IPM/µg DNA wurde nach 90 Tagen ebenfalls alkalisch analysiert. Die ermittelten Molekulargewichte betrugen für die

^3H-DNA 90 000 D , ^{14}C-DNA $1{,}8 \times 10^6$ D.

Der damit eindeutig erbrachte Nachweis für einen zeitabhängig selektiv die ^3H-DNA betreffenden radiolytischen Abbau, stellt die Aussagekraft der in der nachfolgenden HAP-Chromatographie ermittelten Anreicherungsfaktoren für ^3H-markierte i.r. Sequenzen zumindest quantitativ in Frage. Eine Anreicherung der ^3H-fold back Fraktion gegenüber der ^{14}C-fold back Fraktion

bei umgekehrten Fragmentlängenverteilungen (DNA-Fragmentlänge $^{14}C > ^{3}H$) bedeutet, daß infolge einer geringeren Renaturierungswahrscheinlichkeit für die ^{3}H-i.r.Sequenzen tatsächlich viel mehr markiert wurden, und die Anreicherungsfaktoren zu niedrig gemessen wurden.
Setzt man voraus, daß eine Länge von 50 Basenpaaren in der fold back DNA ausreichend ist, um an HAP zu binden (103), so ist die Ausbeute an i.r.Sequenzen ohne Loop nach einer in Abschnitt 4.4. beschriebenen Schätzung 96% bzw 97% , bezogen auf eine Fragmentlänge von 2,5 kb für die ^{3}H-DNA bzw 3,9 kb für die ^{14}C-DNA. Viel niedriger sind jedoch die Ausbeuten für i.r.Sequenzen mit Loop, unter der Annahme einer mittleren Looplänge von 1,7 kb. Die entsprechenden Schätzwerte sind hier 28% bzw 54% für ^{3}H-und ^{14}C-Fragmente. Berücksichtigt man darüber hinaus, daß i.r.Sequenzen mit Loop 2 bis 5 mal häufiger in Ascites-DNA vorkommen als i.r.Sequenzen ohne Loop (Tab. 4.2, Ergebnisse 4.4), so kann man reale Anreicherungsfaktoren bis zu 170% erwarten.

In Anbetracht der guten Übereinstimmung der Anreicherungsfaktoren in Experiment B (134%) und Experiment C (136%) kann man somit folgende Schlüsse ziehen:

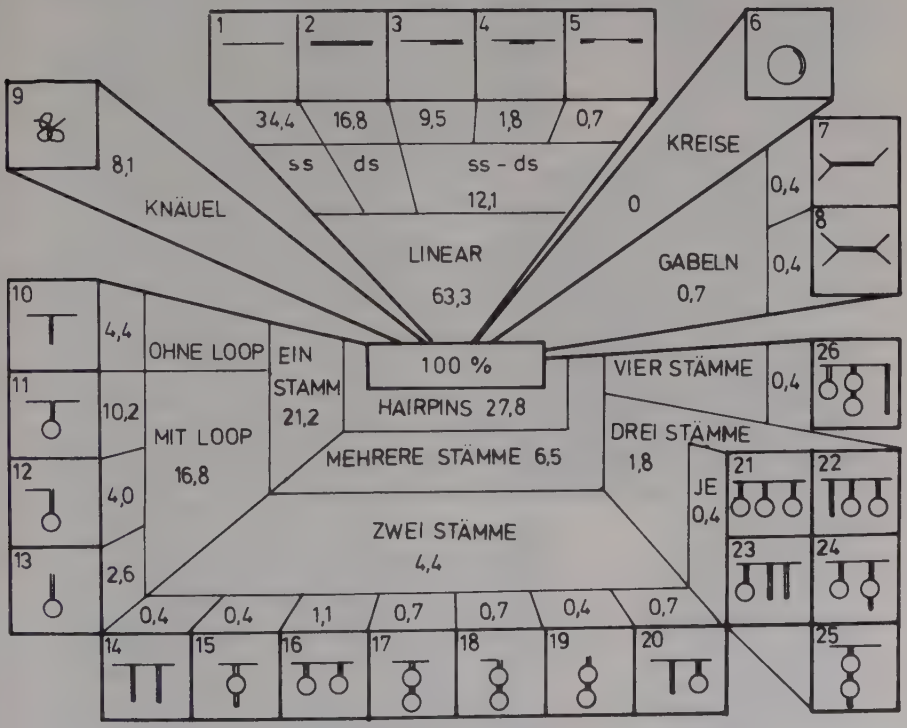
1) Es ist grundsätzlich möglich, nach Aufhebung der Anaerobie relativ mehr i.r.Sequenzen zu markieren, als dies in einer gleichmäßig durchmarkierten DNA möglich ist.
2) Der von den gewählten Zeitwerten günstigste Zeitpunkt für die Markierung der i.r.Sequenzen liegt bei etwa 8 - 10 Min. nach Aufhebung der Anaerobie.
3) Geht man davon aus, daß nach Aufhebung der Anaerobie der überwiegende Anteil der Radioaktivität in neu initiierende Replikons eingebaut wird und nicht in laufende Gabeln, wie dies durch alkalische Gradientenzentrifugation wahrscheinlich gemacht wurde (122), so muß man folgern, daß an der Initiationsstelle auch vermehrt i.r.Sequenzen lokalisiert sind.

4.4. Elektronenmikroskopische Studie von Ehrlich Ascites Hauptbanden fold back DNA

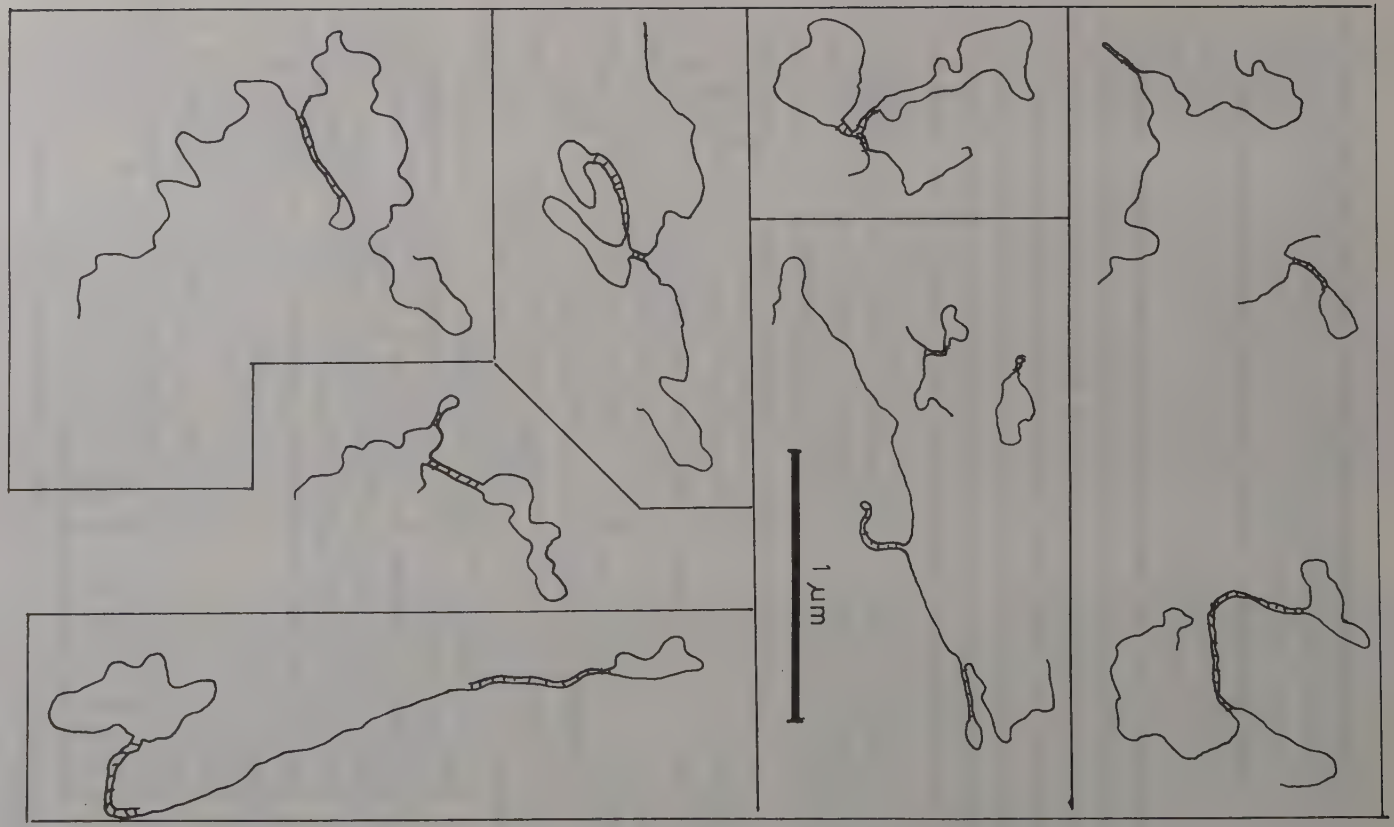
4.4.1. Beurteilung der in der fold back DNA beobachteten Strukturen

Nach den in Teil 4.2 beschriebenen Methoden wurden 3 voneinander unabhängige fold back Präparationen mit einer Isodenaturierungstechnik gespreitet und im Elektronenmikroskop überlappend fotografiert. Die Negative wurden mit einem Projektor auf dem Meßtableau eines Digitizers abgebildet, 273 Moleküle vermessen, und die gewonnenen Daten direkt mit einem angeschlossenen Tischcomputer verarbeitet (2.15.7 und 8).

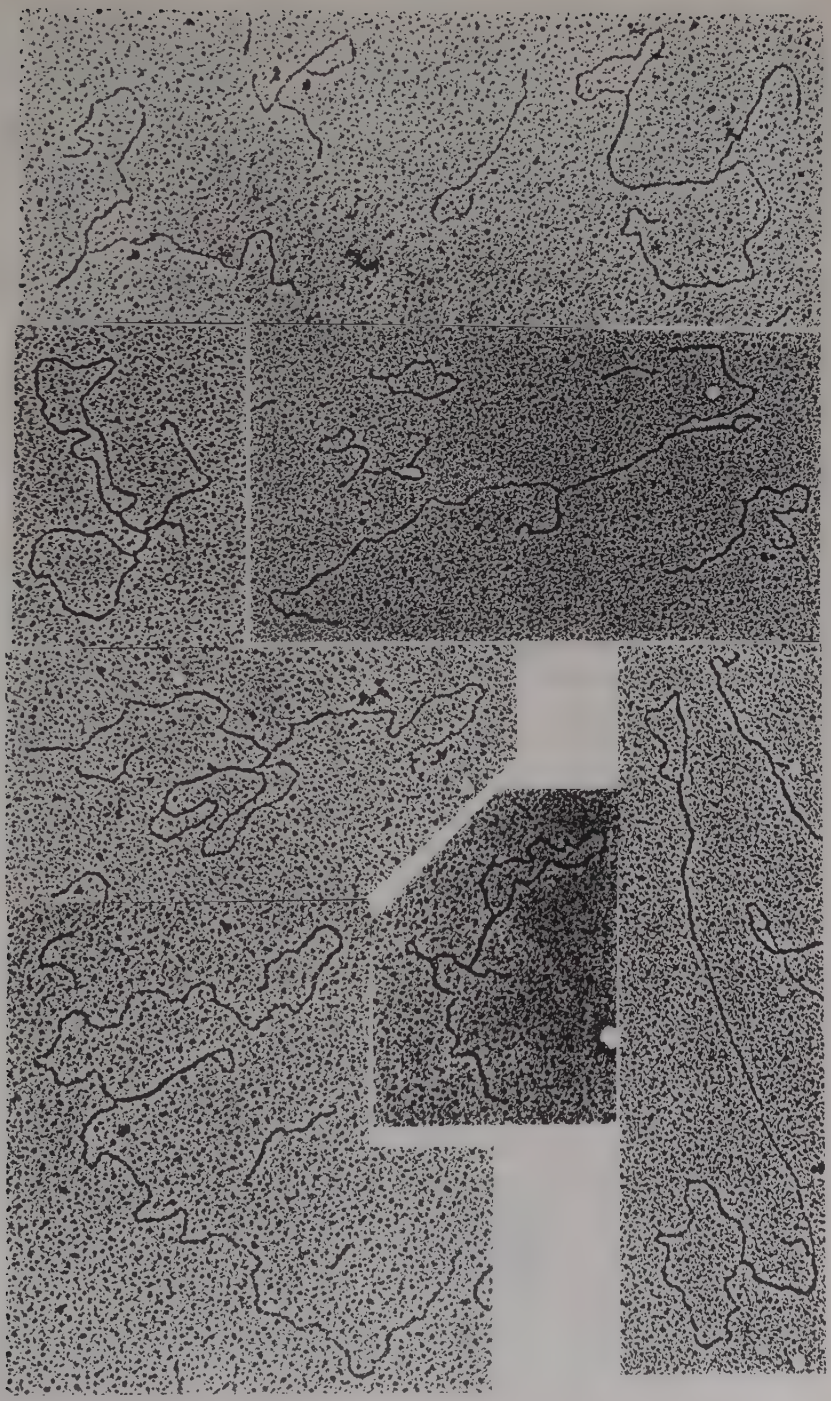
Alle beobachteten Strukturen sind in Tab. 4.7 mit den Nummern 1 bis 26 dargestellt, die Häufigkeiten sind in Prozent ausgedrückt. Die mittlere Fragmentgröße betrug 2,2 /um.



Tab. 4.7 Ascites fold back DNA, beobachtete Strukturen.



Elektronenmikroskopische Darstellung einiger Typen von inverted repeat - Sequenzen



Über ein Viertel der Moleküle in der fold back-Fraktion enthielt Haarnadelstrukturen (hairpins) mit i.r.-Sequenzen, 6,5% aller Moleküle sogar mehrere Hairpins. Nicht auswertbar waren 8,1% Knäuel; multimolekulare Netzwerke, wie sie vor Anwendung der Isodenaturierungstechnik häufig waren, wurden überhaupt nicht beobachtet.

Bei den linearen Strukturen 2 bis 5 und den gegabelten Strukturen 7 und 8 kann ein bimolekularer Reassoziationsvorgang nicht ausgeschlossen werden. Sie repräsentieren zusammen 29,6% der fold back DNA-Fraktion. Die Strukturen 2,3 und 5 können aber auch Moleküle darstellen, die reversibel intramolekular basengepaart sind, d.h. sie können Hairpins ohne Loop, ähnlich der Struktur 10 sein, jedoch mit nur einem oder gar keinem einsträngigen Ende.

Die Genauigkeit, mit der der Übergang ein- in doppelsträngige DNA beobachtet und gemessen wird, muß mit ca. 500 Basenpaaren oder 160 nm angenommen werden (100,103). Mit dieser Einschränkung ergibt sich ein Prozentsatz für den doppelstrang-haltigen Anteil der linearen Fragmente nach meinen Einzelmessungen von 40%. Die große Gruppe der im Elektronenmikroskop durchgängig als einsträngig erkannten Moleküle kann doppelsträngige Bereiche von ca. 50 bis 100 Basenpaaren enthalten. Dies würde zur Bindung an HAP noch ausreichen (19), jedoch nicht sicher im Elektronenmikroskop erkannt werden.

Die Längen s der basengepaarten Stämme aller beobachteten i.r.Sequenzen mit Loop sind in Abb. 4.10b in Histogrammform dargestellt. Wählt man eine Klassenbreite von 40 nm, so findet man 56% aller Stämme zwischen 30 und 70 nm oder zwischen 90 und 210 Basenpaaren. Es sind bei einer mittleren Fragmentgröße von 2,2 μm jedoch Stämme bis zu 3,5 μm beobachtet worden. Obwohl nur 20 i.r.Sequenzen ohne Loop gemessen werden konnten, scheint bei der Stammlängenverteilung kein wesentlicher Unterschied zu den i.r.Sequenzen mit Loop

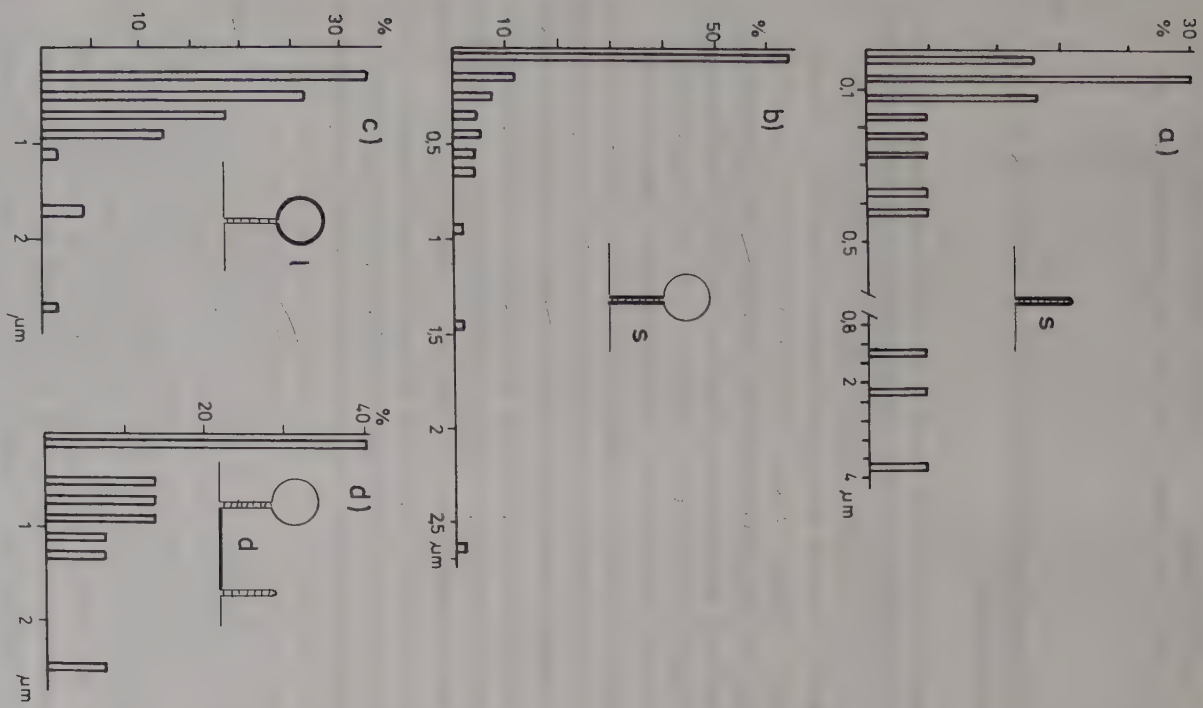


Abb. 4.10 Längenmessungen an inverted repeat Sequenzen: Abszisse Länge in µm, Ordinate relative Häufigkeit.
a) Stammlängen (s) von Hairpins ohne Loop (n=20, $\bar{x}$=0,489 µm, σ = 0,952 µm)
b) Stammlängen (s) von Hairpins mit Loop (n = 81, $\bar{x}$ = 0,203 µm, σ = 0,359 µm)
c) Längen der nichthomologen Loopsequenzen (l) (n = 78, $\bar{x}$ = 0,571 µm, σ = 0,406 µm)
d) Spacer (d) zwischen 2 i.r.Sequenzpaaren (n = 15, $\bar{x}$ = 0,644 µm, σ = 0,659 µm)

zu bestehen. Von den 78 Haarnadelschleifen haben bei einer Klassenbreite von 200 nm über 30% der Moleküle eine Schleifenlänge l von 900 Basen. Das arithmetische Mittel der Schleifenlängen ($\bar{l}$) ist 1700 Basen, die mittlere Stammlänge ($\bar{s}$) 600 Basen.

4.4.2. Abschätzung der Häufigkeit von i.r.Sequenzen im Ascites-Genom

Im folgenden soll eine Schätzung unternommen werden, wieviel Prozent der tatsächlich in der Hauptbande enthaltenen i.r. Sequenzen durch den begrenzenden Einfluß der Fragmentgröße verloren wurden. Anhand der elektronenmikroskopisch ermittelten Daten mittlere Fragmentlänge und mittlere Looplänge, der Annahme, daß die Fragmentlängen normalverteilt sind, und Annahmen über die methodischen Grenzen der HAP-Chromatographie und Elektronenmikroskopie lassen sich die tatsächlich im Ascites-Genom enthaltenen i.r.Sequenzen und der mittlere Abstand zwischen ihnen schätzen.
Man nehme an, daß native DNA, die eine i.r.Sequenz ABC-l-C'B'A' enthält, in Fragmente der Länge L zerlegt wird. Wenn s in kb die Länge eines jeden der beiden i.r.Sequenzen ist und l (kb) die beiden Abschnitte s trennt, dann können nur jene Fragmente Haarnadeln ausbilden, die die gesamte Länge l und eine minimale Länge s_o von jeder s Sequenz enthalten. Der Teil aller möglichen Fragmente, der dieses Kriterium erfüllt, ist gleich der Wahrscheinlichkeit P(L) zur Haarnadelbildung (103):

$$P(L) = 0 \qquad \text{für } L \leq l + 2s_o$$

$$P(L) = \frac{L - l - 2s_o}{L} \qquad \text{für } L > l + 2s_o$$

Die Größe s_o hängt vom Auflösungsvermögen der Methode zur fold back-Isolierung ab. Um von HAP unter meinen Bedingungen in der fold back Fraktion angereichert zu werden, sind etwa 50 Basenpaare erforderlich, wohingegen zur sicheren Beobachtung im Elektronenmikroskop ein s_o von ca. 100 Nucleotiden angenommen werden muß. Obige Gleichung ist in Abb.4.11

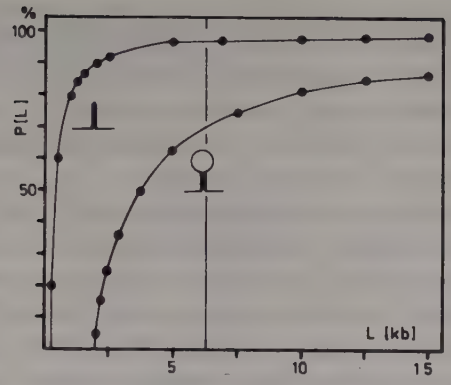


Abb. 4.11 Wahrscheinlichkeit für die Entstehung und Isolierung von Hairpins durch HAP Chromatographie in Abhängigkeit von der Fragmentlänge

graphisch dargestellt. Für i.r.Sequenzen mit Loop sei die Looplänge (l) 1,7 kb, für i.r.Sequenzen ohne Loop ist l=0; s_o sei 0,1 kb.

Geht man von der meinen Versuchen zugrundeliegenden Fragmentlänge von 2,2 /um oder 6,6 kb aus, so ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 97% für i.r.Sequenzen ohne Schleifen und eine Wahrscheinlichkeit von 70% für i.r.Sequenzen mit Schleifen, in meiner foldback Fraktion der HAP-Chromatographie enthalten zu sein. Will man einen Schätzwert für die Zahl der i.r.Sequenzpaare pro m Ascites DNA aufstellen, so müssen die tatsächlich gefundenen 20 i.r.Sequenzpaare ohne Schleife und die 81 mit Schleife bei einer vermessenen Länge von (273 x 2,2) 600 /um um die oben ermittelte Wahrscheinlichkeit korrigiert werden, d.h. 21 bzw 115 i.r.Sequenzen pro 600 /um. Da die fold back-Fraktion ca 9% der Gesamt-DNA darstellt, ergibt sich für die Umrechnung der Gesamtzahl der i.r.Sequenzpaare auf ein m ein Faktor von (0,09m : 600 /um) 150. Die berechneten i.r.Sequenzpaare/m Ascites-DNA sind:

17.350 i.r.Sequenzpaare mit Loop
3.150 i.r.Sequenzpaare ohne Loop
20.500 i.r.Sequenzpaare insgesamt.

Der durchschnittliche Spacerabschnitt zwischen beliebigen i.r.Sequenzpaaren beträgt (1m : 20500) 49 /um.

Diese Ergebnisse können mit den in der Literatur berichteten (Tab. 4.2) verglichen werden. Die von Wilson und Thomas (19) ermittelten 15.000 i.r.Sequenzpaare/m in Maus L Zellen-DNA sind ohne Loop und wurden durch eine andere Methodik, nämlich S 1 Nuclease-Verdauung der renaturierten DNA und anschliessende HAP Chromatographie ermittelt. Georgiev et al. (104) arbeitete ebenfalls mit Einstrangnucleaseverdauung und HAP-Chromatographie unter milderen Elutionskriterien und fand 150.000 i.r. Sequenzpaare pro m Ascites-DNA. Am ehesten mit meinen Bedingungen vergleichbar ist die Arbeit von Cech und Hearst (103), die 36.000 i.r.Sequenzpaare/m Maus SVT2-DNA gefunden haben, davon 21.000 mit Loop. Möglicherweise wurde ein Teil der i.r.Sequenzen ohne Loop von mir bei der elektronenmikroskopischen Auswertung unterschätzt und den Strukturen 2 und 3 in Tab. 4.7 zugeordnet.

Über das Verteilungsmuster der i.r.Sequenzen im Genom, ob zufällig verteilt oder gruppiert (Cluster), kann ich keine sicheren Aussagen machen. Dazu waren die untersuchten Fragmentlängen zu kurz. Von den 273 Molekülen enthielten nur 15 mehrere i.r.Sequenzen mit Spacern (Abb. 4.10d). Unter der Annahme einer zufälligen Verteilung der i.r.Sequenzen müßten die Spacer-Abschnitte wie oben ermittelt um einen Mittelwert von 49 /um schwanken; da die mittlere Fragmentlänge aber nur 2,2 /um betrug, können nur die kleinsten Spacer beobachtet werden. Ein Verteilungsmuster, bei dem 2 bis 3 i.r.Sequenzen gehäuft vorkommen (Cluster), wurde für SVT2 DNA (103) und Maus L-Zellen (19) postuliert. Der Abstand zwischen 2 i.r. Sequenzen im Cluster wurde für HeLa-Zellen mit 0,6 /um ermittelt, und durchschnittlich befinden sich 2,8 i.r. Sequenzpaare im Cluster (19). Da die von mir beobachteten Spacer einen Mittelwert von 0,6 /um und ein deutliches Häufigkeitsmaximum bei 0,15 /um haben erscheint es wahrscheinlich, daß ein Teil i.r.Sequenzen auch in Ascites-DNA gruppiert vorkommen.

5. ELEKTRONENMIKROSKOPISCH KONTROLLIERTE ANREICHERUNG REPLIZIERENDER DNA

5.1. Vorbemerkungen

Die bemerkenswerten elektronenmikroskopischen Studien über eucaryontische Replikation wurden an Hefe (9), Embryoanalzellen von Drosophila (8,123) und Seeschnecken (10), und an Hamsterzellen nach Blockaufhebung (124) durchgeführt. Der Vorteil dieser Zellsysteme liegt in ihrer kurzen oder synchronen S-Phase, wodurch kleine Replikationseinheiten und dicht beieinanderliegende Initiationsstellen als Blasenmuster und in Form laufender Gabeln in großer Zahl beobachtbar werden. Die Suche nach Replikationsgabeln in DNA-Präparationen aus asynchronen differenzierten Zellen, beispielsweise unseren Ascites-Zellen gerät demgegenüber nach einer groben Schätzung zur Sisiphusarbeit.
Geht man von einer durchschnittlichen Replikonlänge von 70 µm und einer Gabelgeschwindigkeit von 0,6 µm/Min. aus, so enthält jedes aktive Replikon ca. 1 h lang zwei laufende Gabeln. Berücksichtigt man eine Zellcyklusdauer mit ca. 20 h, so ist im Durchschnitt nach ca. 700 µm linearer DNA mit einer Replikationsgabel zu rechnen. Das binokulare Gesichtsfeld am Elektronenmikroskop durchmißt bei der hier üblichen Vergrößerung jedoch nur 0,5 µm.

Erfahrungsgemäß ist es nicht möglich, DNA-Moleküle länger als über eine Distanz von ca. 40 µm im Elektronenmikroskop zu verfolgen. Trotzdem können einzelne Replikationsstrukturen aus differenzierten Zellen beobachtet werden, wenn es gelingt, die Nucleinsäuren schonend zu reinigen, zu fragmentieren und die replizierenden Fragmente gegenüber der rein doppelsträngigen DNA anzureichern. Die dazu notwendigen Methoden werden seit einiger Zeit in unserem Labor angewandt und in der letzten Zeit weiter verbessert (125).

Auf Teilaspekte der Fragmentierung, der Anreicherung und der Elektronenmikroskopie solcher DNA-Präparationen wird in Teil 5.2 eingegangen. In Abschnitt 5.3 wird eine Aufarbeitung be-

schrieben, bei der neusynthetisierte, dichtemarkierte DNA nach Fragmentierung und chromatographischer Anreicherung im isopyknischen Gradienten weiter aufgetrennt wurde, und dann aus diesem Gradienten einzelne Fraktionen elektronenmikroskopisch untersucht wurden.

5.2. Methodische Probleme der Anreicherung und Elektronenmikroskopie von Replikationsstrukturen.

Auf Darstellung und Diskussion methodischer Varianten der DNA-Reinigung wird hier verzichtet und auf Ref. 125 verwiesen. Zwei Experimente zu Fragestellungen der Kryolyse und Nitrocellulose-Chromatographie sollen jedoch erwähnt werden. Die zu klärenden Fragen waren:

- wie verhält sich eine Nucleinsäure diskreter Länge bei der Kryolyse; sind die Fragmentlängen annähernd exponential verteilt?
- werden durch Fragmentierung einer einheitlich doppelsträngigen DNA nach der Kryolysemethode Fragmente mit längeren Einstrangbereichen (Gaps), die an Nitrocellulose binden können zusätzlich erzeugt ?
- wie lang müssen die einsträngigen DNA-Abschnitte sein, um an Nitrocellulose unter den üblichen Chromatographiebedingungen zu binden ?

Zur Klärung dieser methodischen Unsicherheiten bot sich als Test-DNA der Phage λ an. Zum einen hat λ-DNA eine diskrete Länge von ca 14,8 /um und liegt damit im Bereich der längsten durch Kryolyse an zellulärer DNA erzeugten Fragmente, zum anderen besitzt sie zwei kohäsive Enden (einsträngig) mit 12 Basen Länge.

Die nach (2.5.4) ^{14}C markierte λDNA wurde kryolisiert, und nach (2.13) in neutralen Sucrosegradienten analysiert und die Fragmente auf Exponentialverteilung geprüft (Abb. 5.1). Sowohl λDNA als auch ihre Kryolysefragmente wurden an Nitrocellulose-Säulen chromatographiert. Die Auftragslösungen enthielten jeweils 40 /ug DNA in 10 ml und wurden unmittelbar vor der Chromatographie erhitzt und schnell abgekühlt.

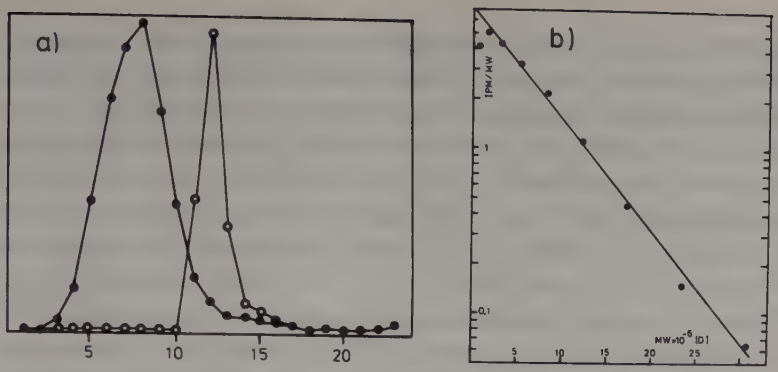


Abb. 5.1 Sucrosegradientenzentrifugation von λ DNA.
a) ○ λ DNA nicht fragmentiert, ● λ Kryolysefragmente
b) Prüfung der Kryolysefragmente auf Exponentialverteilung.

Der bindende und irreversibel bindende Anteil von 4 Säulen in % der Auftragsfraktion mit durchschnittlich 60 000 IPM wurde nach 2.12.4 ermittelt:

	bindend	irreversibel bindend
p lac 5 DNA	0,7 %	0,3 %
Kryolysefragmente	0,8 %	0,1 %

Die Bindung ist durchweg 1%, ein Wert wie man ihn bei wiederholter Chromatographie einer nicht bindenden DNA findet. Dies zeigt zum einen, daß Einstrangbereiche von 12 Basen Länge zur Bindung an Nitrocellulose nicht ausreichen, und zum anderen, daß die Kryolyse selbst keine neuen Bindungspunkte in doppelsträngiger DNA schafft.

Für die elektronenmikroskopische Präparation von Nucleinsäuren nach Kleinschmidt und Zahn (73) stehen 2 Wege offen, die DNA an einen basichen Proteinfilm zu adsorbieren, die Spreitungsmethode und die Diffusionsmethode. Im ersten Fall läßt man eine verdünnte Lösung von Cytochrom c zusammen mit der Nucleinsäure eine Rampe zur Hypophase hinunterfließen, wobei das Cytochrom an der Luft-Hypophasengrenze plötzlich denaturiert und sich fleckförmig ausbreitet. Bei der Diffusionsmethode adsorbiert die in der Hypophase gelöste Nucleinsäure nach den Gesetzen der Diffusion an einen präformierten

Cytochrom c - Film. Unterschiede in der Herstellung des Filmes bedingen auch unterschiedliche Scherbelastungen für die darzustellende Nucleinsäure. Dies wurde daran deutlich, daß es nur mit der Diffusionsmethode möglich war, überwiegend ringförmig geschlossene λ-Moleküle zu präparieren. Bei der Spreitungsmethode fuhren die kohäsiven Enden auseinander, so daß allenfalls "pulled apart" -Moleküle (49) dargestellt werden konnten.

Um festzustellen, ob bei der Spreitungsmethode auch kovalente Säureesterbindungen des Zucker-Phosphatskeletts zerrissen werden, also vorzugsweise im Bereich der Verzweigung von Replikationsgabeln, wurde eine angereicherte Gabel-Fraktion nach beiden Methoden elektronenmikroskopisch ausgewertet. Bei 200 Molekülen nach der Diffusionsmethode und 100 Molekülen nach der Spreitungsmethode wurden 6 bzw 2 Gabeln gezählt, also 3% und 2%. Leider sind diese Zahlen in keiner Weise signifikant. Trotzdem wurden alle quantitativen Untersuchungen (5.3.) vorsorglich nach der Diffusionsmethode durchgeführt. Ein Nachteil der Diffusionsmethode ist aber, daß die Adsorbtion der DNA-Moleküle an den Proteinfilm von der Diffusionszeit und letztendlich von ihrem Molekulargewicht abhängt (127). Um quantitative Betrachtungen über die adsorbierten Fragmentlängen zu ermöglichen, wurde der Weg der erschöpfenden Diffusion gewählt. Die notwendige Diffusionszeit für einen 30 µl Tropfen wurde anhand von λ-Endo Eco R I -Fragmenten ermittelt. Es dauerte ca. 15 Min. bis das kleinste und größte Fragment mit der gleichen Häufigkeit adsorbiert war. Da "Gabel-Präparationen" auch Fragmente enthielten, deren Molekulargewicht über den λ-Fragmenten lag, wurde die Diffusionszeit generell auf 60 Min. erhöht. Bei obenerwähntem Vergleich zwischen 200 nach der Diffusionsmethode präparierten Molekülen und 100 Molekülen nach der Spreitungsmethode betrugen die mittleren Längen $\bar{x}_{200} = 2{,}72\,\mu m$ bzw $\bar{x}_{100} = 2{,}84\,\mu m$ und zeigen somit gute Übereinstimmung. Ein nichtkompensierbarer Nachteil der Diffusionsmethode ist die Adsorption von Verunreinigungen aus Hypophase und Luft an den Proteinfilm und die schlechtere Unterscheidbarkeit zwischen ein- und doppelsträngiger DNA gegenüber der Spreitungsmethode mit Formamid.

Bei den im Elektronenmikroskop an Nucleinsäuren unter den gewählten Bedingungen beobachtbaren Details handelt es sich um die Unterscheidung von ein- und doppelsträngiger DNA und um Verzweigungen. Einstrangbereiche von mehr als 30 Basen Länge sind in allen Molekülen zu erwarten, die über NC-Chromatographie angereichert wurden (128). Sie können aber nur dann im Elektronenmikroskop an ihrer dünneren Kontur sicher erkannt werden, wenn sie wenigstens 100 Nucleotide oder 30 nm lang sind. Enthält ein Molekül einen Verzweigungspunkt mit 3 freien Enden (Gabelzinken) so handelt es sich um eine Replikationsgabel. Die Unterscheidung echter Verzweigungen von lateralen Aggregationen und von Pseudoverzweigungen, die durch geordnete Kornstrukturen vorgetäuscht werden, wurde nach Kriterien vorgenommen, die unter Ref. 40 beschrieben sind. Frühe Initiationsstrukturen zeigen zwei auseinanderlaufende Gabeln und sind in Gestalt von Blasen (Bubble) zu erwarten. Späte Initiationsstrukturen sind zunehmend scherempfindlich und sind nach einem Strangbruch zwischen den Verzweigungspunkten (geplatzte Blase) nicht mehr von Terminationsstrukturen unterscheidbar, die ebenfalls 2 Verzweigungspunkte enthalten.

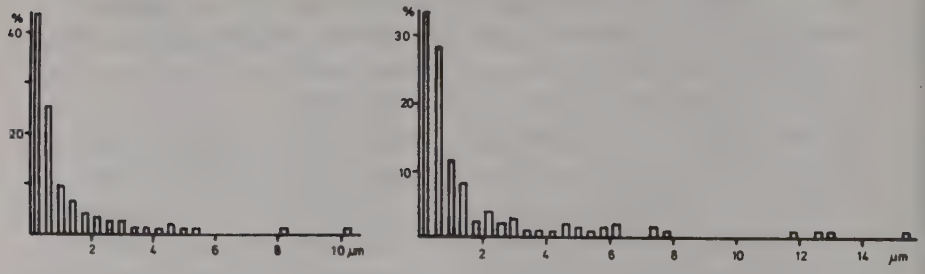
Beim Mikroskopieren hochmolekularer, über CsCl-Gradienten gereinigter, nicht chromatographierter DNA wurden folgende Beobachtungen gemacht. Obwohl bei der Spreitung dieser langen Moleküle, beim Übergang von einem dreidimensionalen Netzwerk in einen zweidimensionalen, monomolekularen Film starke Scherkräfte und Zugspannungen angenommen werden müssen, konnten vereinzelt Replikationsgabeln dargestellt werden, deren einzelne Gabelzinken über 20 µm lang waren.
Die Beurteilung von Initiations- und Terminationsstrukturen war dadurch erschwert, daß sich die Moleküle häufig überkreuzten. Einstrangbereiche waren häufig an den Enden linearer Moleküle, an einem oder mehreren Enden von Gabelzinken und am Verzweigungspunkt der Replikationsgabel zu sehen. Teilweise enthielten diese einsträngigen Enden inverted repeats.

Nach (2.4.4) schonend mit präparativen CsCl-Gradienten gereinigte DNA wurde mit der Kryolysemethode fragmentiert, die neusynthetisierte DNA mittels NC-Chromatographie angereichert, und sowohl von der NC-bindenden wie der nicht bindenden Fraktion elektronenmikroskopische Präparate hergestellt. Im Gegensatz zu den Präparaten hochmolekularer DNA lagen die Moleküle überwiegend einzeln ohne gegenseitige Überschneidungen, und wurden bezüglich ihrer Struktur und Häufigkeit quantitativ ausgewertet (Tab 5.1).

Tab. 5.1 Elektronenmikroskopische Auswertung von fragmentierter DNA nach Nitrocellulose (NC)-Chromatographie.

an Nitrocellulose	nicht bindend	bindend
Anzahl der gemessenen Moleküle (n)	400	200
mittlere Länge $\bar{x}_n$	0,945 /um	1,43 /um
Anzahl Gabeln (m)	-	9
" " % von n	-	4,5%
mittlere Länge der Gabeln $\bar{y}_m$	-	3,11 /um
$\bar{y}$/mittlere lineare Fragmentlänge	-	3,29
Blasen (bubble): Anzahl; Häufigkeit (%)	-	2; 1%
Doppelgabeln: Anzahl; Häufigkeit (%)	-	1; 0,5%

Abb. 5.2 Längenhistogramme der an NC nicht bindenden (a) und bindenden (b) Fragmente von Tab. 5.1

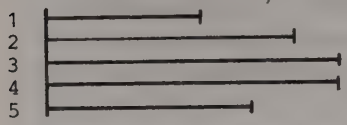


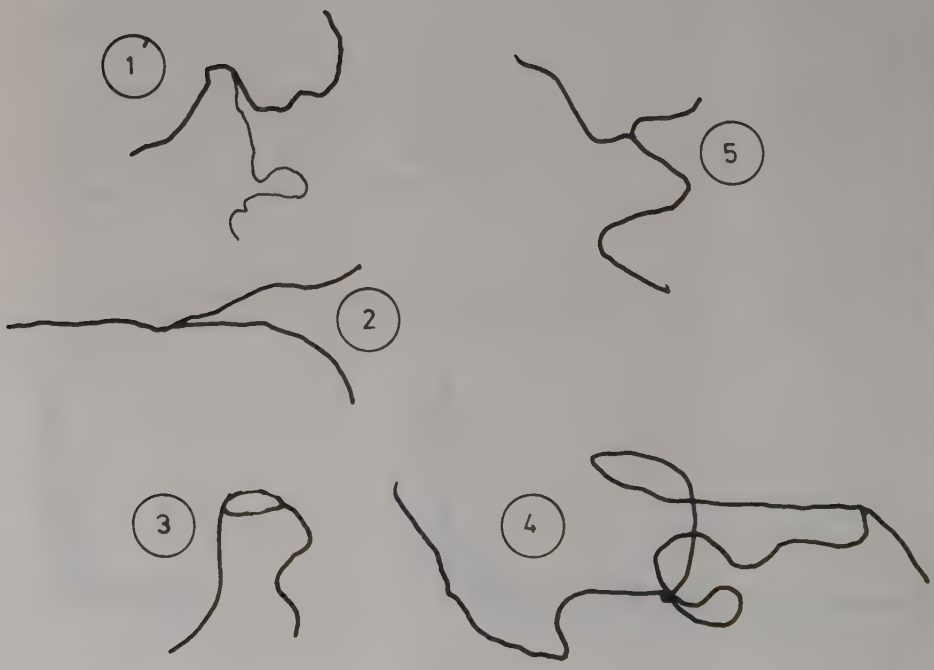
Einfache Replikationsgabeln mit 3 Zinken wurden als häufigste,verzweigte Struktur beobachtet. Neben einigen kleinen Blasen enthielt die Präparation auch zwei Moleküle mit zwei Verzweigungspunkten. Längenmessungen an den freien Gabelzinken und dem DNA-Abschnitt zwischen den Verzweigungspunkten ("Spacer") ergab, daß die Länge des Spacers in einigen Fällen der Summe zweier freier Gabelzinken entsprach, so daß mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, daß es sich bei diesen Molekülen um "geplatzte Blasen" oder um initiierende Replikons handelte. Mögliche Terminationsstrukturen wurden ebenfalls dokumentiert (S. 94-97). Die quantitativen Verhältnisse zwischen Replikationsstrukturen, Längen und Häufigkeiten sind in Tab. 5.1 und Abb. 5.2 zusammengestellt, und werden zusammen mit den Ergebnissen von Abschnitt 5.3 in Abschnitt 5.4 diskutiert.

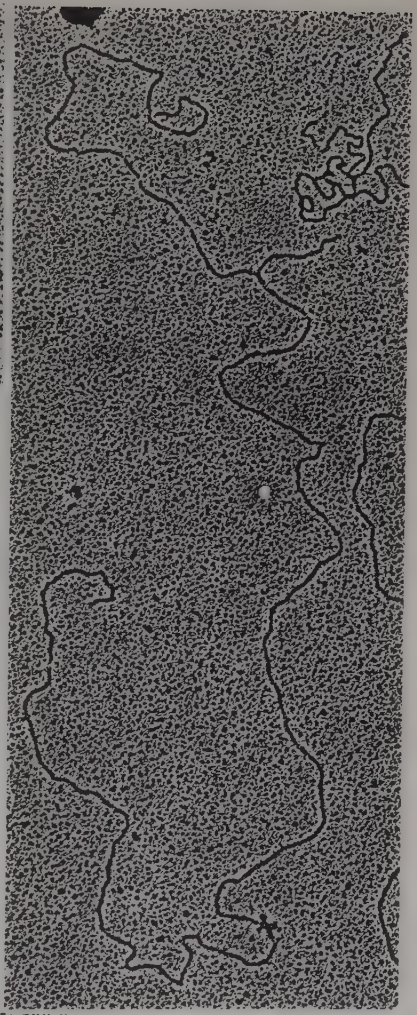
Elektronenmikroskopische Darstellung von replikativen Strukturen (Abbildungen

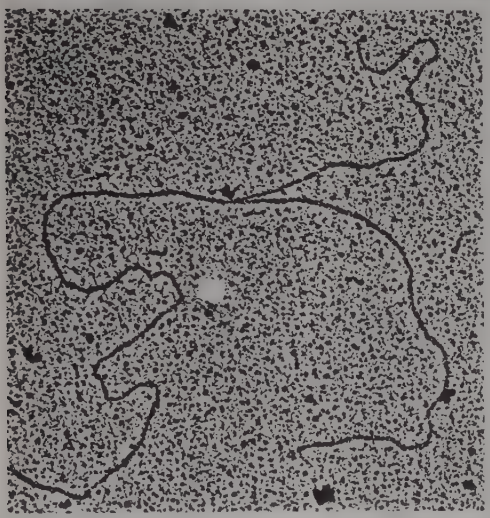
Die Moleküle 1, 2 und 5 stellen "laufende Gabeln" dar. Ein Gabelzinken von Molekül 1 ist vollständig einsträngig. Molekül 3 enthält ein "Bubble" (initiierendes Replikon). Molekül 4 kann als Initiationsstruktur mit zwei auseinanderlaufenden Gabeln gedeutet werden. Ein Verzweigungspunkt ist mit Protein besetzt.

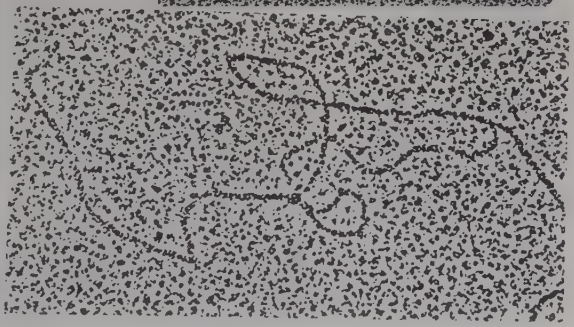
Maßstab (die Länge der Striche für jedes Molekül entspricht jeweils 1 /um)







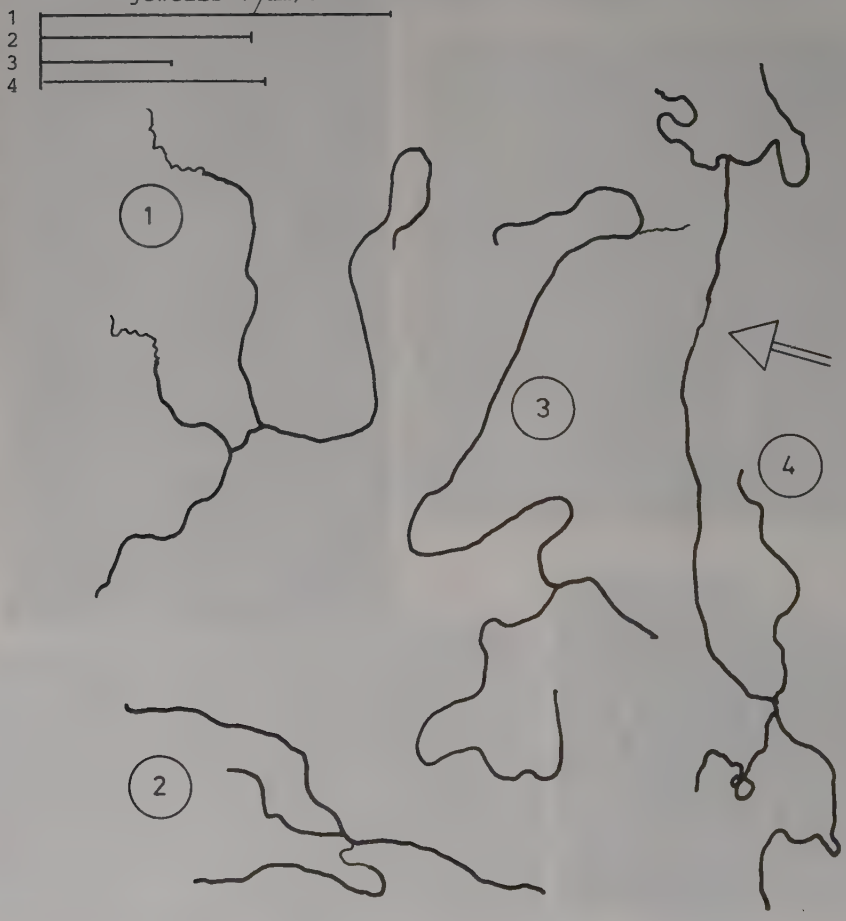


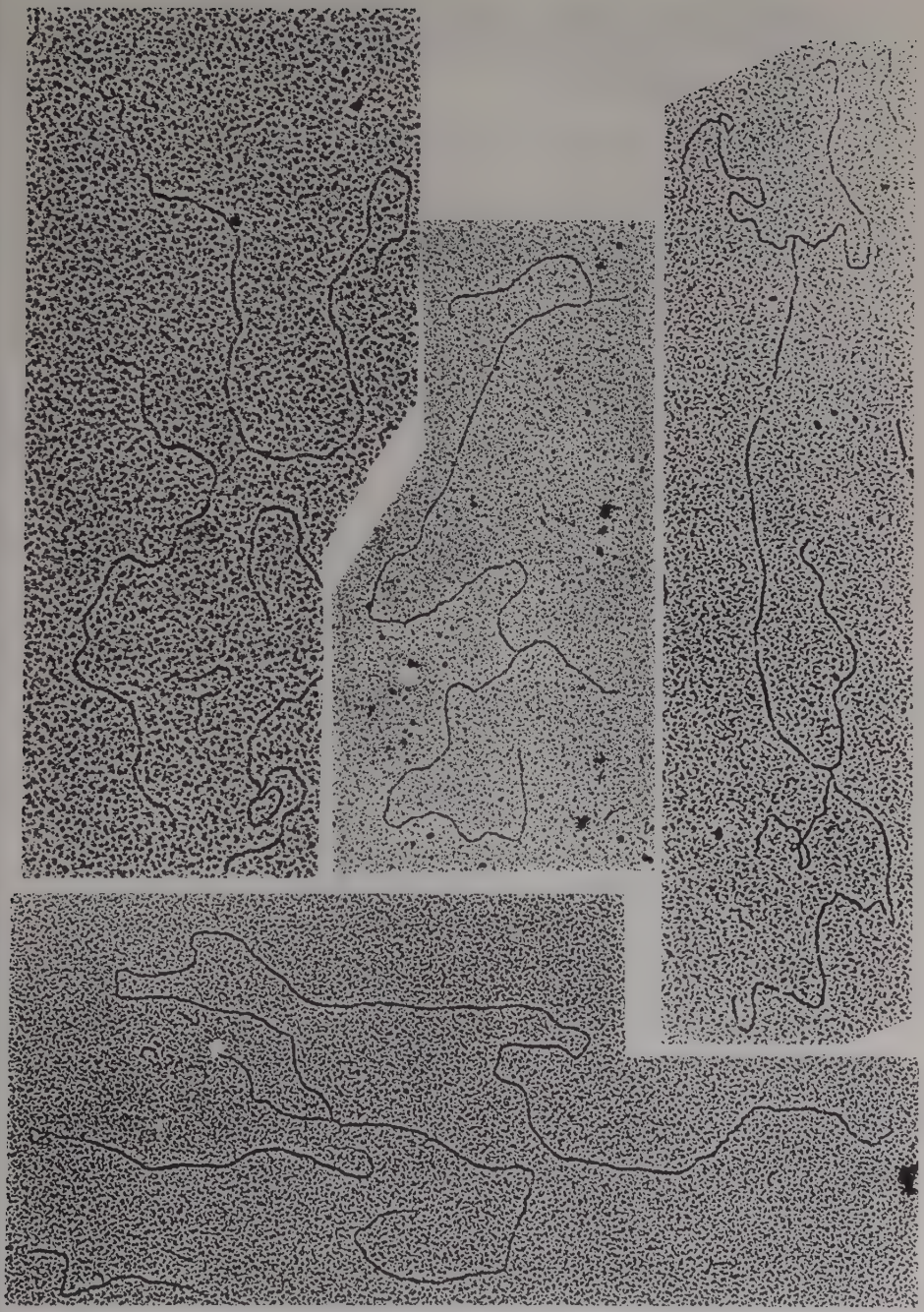


Elektronenmikroskopische Darstellung von replikativen Strukturen (Abbildungen)

Die Moleküle 1,2 und 4 enthalten 2 Replikationsgabeln, die offensichtlich aufeinander zulaufen. Bei Molekül 3 kann nicht sicher entschieden werden, ob es sich um ein frisch initiiertes Replikon ("geplatzte Blase") oder um eine Terminationsstruktur handelt. Molekül 4 besitzt einen kurzen einsträngigen Abschnitt (Pfeil). Möglicherweise handelt es sich hier um eine Initiationsstelle, von der aus sich zwei Gabeln entfernt haben, wobei die nach unten laufende Gabel bereits durch eine entgegenkommende Gabel "terminiert" wurde.

Maßstab (Die Länge der Striche für jedes Molekül entspricht jeweils 1 µm):





5.3. Quantitative Untersuchungen an neusynthetisierter dichtemarkierter DNA aus verschiedenen Fraktionen eines CsCl-Gradienten

700 x 10^6 Ascites-Zellen wurden in vitro 3 h nach (2.3.4.) mit Brom-desoxy-Uridin dichtemarkiert, die Zellkerne isoliert (2.4.2) und lysiert. Eine erste Reinigung der freigesetzten DNA erfolgte schonend über 2 präparative CsCl-Gradienten. Die hochvisköse DNA wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, mit einem Mörser zerrieben, kryolysiert, und anschliessend nochmals bei hoher Ionenstärke phenolisiert (2.4.5.). Vor der Nitrocellulosechromatographie wurden der fragmentierten DNA Aliquots einer unter den gleichen Bedingungen aufgearbeiteten dichte- und ^{3}H-markierten DNA (30 Min-Puls mit ^{3}H-desoxy-Cytidin , 2 µCi/ml, spez. Aktivität 27 Ci/mMol; 5 x 10^{-7}M nicht radioaktiv markiertes Cytidin; 50 Min-BrUdR dichtemarkiert, beginnend 20 Min. vor der ^{3}H -Markierung nach 2.3.4) und einer ^{14}C-langzeitmarkierten DNA nach (2.3.1) zugemischt, die mir freundlicherweise von E. Helftenbein überlassen wurden. Der Anteil der radioaktiv markierten DNAs an der nichtradioaktiv markierten DNA betrug 0,7%. Die an Nitrocellulose bindende Fraktion wurde im CsCl-Gradienten nach (2.7.2) entsprechend ihrer Dichtemarkierung aufgetrennt. Das Radioaktivitätsprofil der zugemischten ^{14}C-DNA entspricht der Verteilung nicht dichtemarkierter Ascites DNA im Gradienten, die eine Schwebedichte von 1,708 g/ml in CsCl aufweist. Die Verteilung der ^{3}H-Markierung im Gradienten repräsentiert neusynthetisierte DNA, die gleichzeitig dichtemarkiert ist, und zwar mit demselben Substitutionsgrad wie die in den selben Fraktionen in großem Überschuß befindliche nicht radioaktiv markierte DNA. Der Gipfel der ^{3}H-dichtemarkierten DNA entspricht bei einer Dichte des Gradienten von 1,745 g/ml der Schwebedichte linearer Fragmente, deren Tochterstrang durchgehend dichtemarkiert ist. Das zur leichten Seite hin asymmetrische Gipfelprofil der ^{3}H-dichtemarkierten DNA wird dadurch erklärt, daß es neusynthetisierte lineare und verzweigte Fragmente gibt, die zum Zeitpunkt der Fragmentierung gerade replizierend waren, so daß sie nur teilweise schwere Tochterstränge enthalten. In diesen Frak-

tionen sind Replikationsgabeln, Initiations- und Terminationsstrukturen ebenso wie Bruchstücke dieser Strukturen zu erwarten.

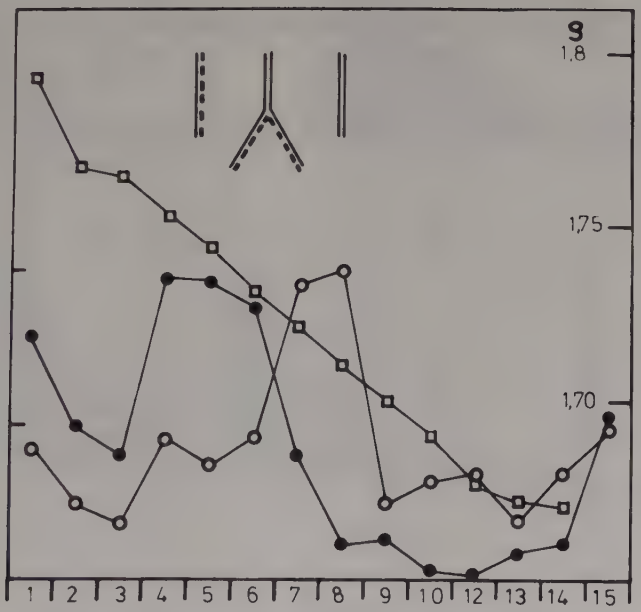


Abb. 5.3 Präparativer CsCl-Gradient mit dichtemarkierter DNA. Erläuterungen s.o.
● 3-H/BrUdR markierte DNA; ○ 14-C markierte DNA

Von den dialysierten Fraktionen 3-9 des CsCl-Gradienten und der nicht an Nitrocellulose bindenden Fraktion wurden elektronenmikroskopische Präparate nach der Diffusionsmethode hergestellt, repräsentative Areale überlappend fotografiert und von jeder Fraktion mehrere 100 Moleküle nach Struktur und Längen ausgewertet. Die CsCl-Fraktion 4 wurde zusätzlich nach der Spreitungsmethode analysiert, das Ergebnis bereits diskutiert. Sämtliche quantitativen Beobachtungen sind in Tab. 5.2 zusammengestellt, die Molekulargewichtsverteilungen der Fraktionen sind in Histogrammform in Abb. 5.4 dargestellt.

Tab. 5.2 Daten für dichtemarkierte DNA in verschiedenen Fraktionen eines CsCl-Gradienten

Herkunft der DNA	an Nitrocellulose bindend								nicht bindend
Fraktion im CsCl Gradienten	3	4	4 +)	5	6	7	8	9	-
Anzahl aller gemessenen Moleküle (n)	300	200	100	300	200	200	200	200	400
mittlere Länge $\bar{x}_n$ (/um)	1,41	2,73	2,84	2,08	2,20	2,25	2,78	1,37	1,11
Standardabweichung	1,24	1,93	1,49	1,78	1,94	2,11	1,89	1,42	1,29
davon									
Gabeln									
Anzahl (m)	5	6	2	11	16	12	3	1	2
Häufigkeit (%)	1,67	3,0	2,0	3,6	8,0	6,0	1,5	0,5	0,5
mittlere Länge der Gabeln $\bar{y}_m$	1,9	4,9	4,9	3,63	5,1	4,01	2,48	5,09	2,7
Doppelgabeln									
Anzahl (o)	-	1	-	3	-	-	1	-	-
mittlere Länge $\bar{z}_o$		2,19		5,17			5,51		

+) Daten wurden hier nach der Spreitungsmethode ermittelt, sonst Diffusionsmethode

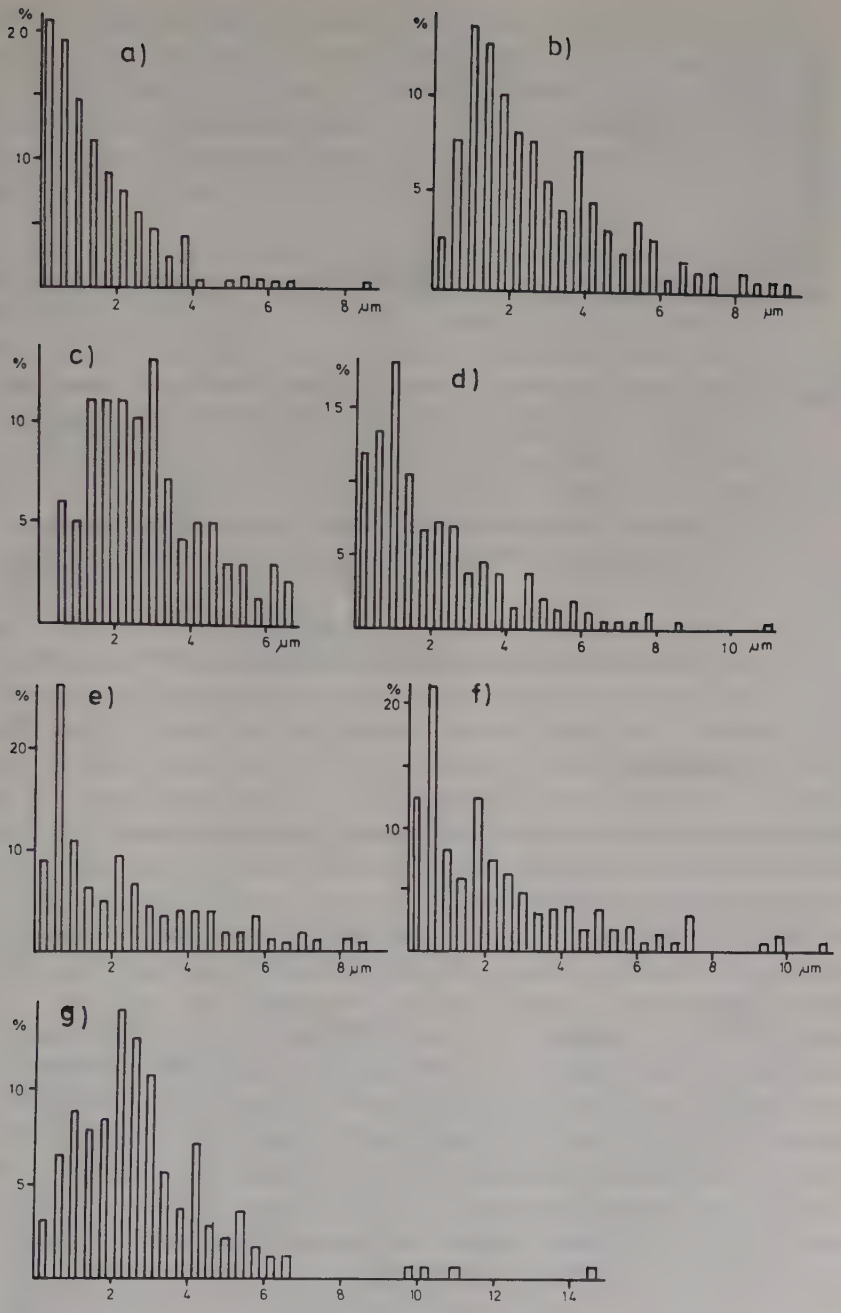


Abb. 5.4

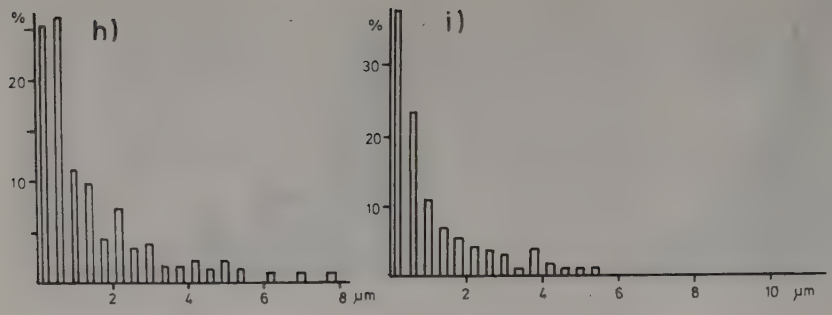


Abb. 5.4 Längenhistogramme dichtemarkierter DNA aus verschiedenen Fraktionen eines CsCl-Gradienten (s. Abb. 5.3) Jedes Histogramm repräsentiert mehrere hundert Moleküle (für n siehe Tab. 5.2). Bei verzweigten Molekülen wurden die Gabelzinken aufsummiert. Die Längenmessungen wurden mit Ausnahme von c an Präparaten durchgeführt, die nach der Diffusionsmethode (2.15.5.3) dargestellt wurden. Die Histogramme repräsentieren folgende Fraktionen des CsCl-Gradienten:
a) Fr. 3 b) Fr. 4 c) Fr. 4 Spreitung d) Fr. 5
e) Fr. 6 f) Fr. 7 g) Fr. 8 h) Fr. 9
i) Histogramm der nicht NC-bindenden Fraktion

5.4. Diskussion

Betrachtet man die beiden Experimente zur Anreicherung frisch replizierter DNA (Tab. 5.1; Tab. 5.2), so kann man folgende Anmerkungen machen.
Zunächst fällt auf, daß die an Nitrocellulose bindenden Fragmente ein höheres mittleres Molekulargewicht besitzen, als die entsprechenden nicht bindenden Fragmente, und zwar in Expt. 5.1 um den Faktor 1,51, und in Expt. 5.2 um einen Faktor über 2, wenn man $\bar{x}$ in den Fraktionen 4 bis 8 des CsCl-Gradienten mit $\bar{x}$ der nicht NC-bindenden Fraktion vergleicht. Dieses höhere mittlere Molekulargewicht kann aber nicht allein mit den beispielsweise 4,5% Gabeln (Tab. 5.1) erklärt werden, die in den NC-bindenden Verteilungen enthalten sind. Tatsächlich sind diese Gabeln, bezogen auf die linearen Fragmente der nicht an Nitrocellulose bindenden Fraktion in

Expt. 5.1 um den Faktor 3,29, und in Expt. 5.2 um den Faktor 3,71 (Mittelwert aller 56 beobachteten Gabeln aus allen CsCl-Fraktionen = 4,12 /um : 1,11 /um) größer. Auch nach Abzug der verzweigten Moleküle sind die verbleibenden linearen NC-bindenden Fragmente größer als die nicht NC-bindenden Fragmente. Wie ist das zu erklären ?

Nach R. Wais und H. Probst (129) ist das erwartete Molekulargewicht statistisch nach der Kryolyse fragmentierter DNA für einfach verzweigte Replikationsgabeln 3 mal höher als für lineare Fragmente. Dieser erstaunliche Wert wird durch einen Sachverhalt verursacht, der in der Wahrscheinlichkeitstheorie häufig mit der Bezeichnung "waiting time paradox" belegt wird (126). Weiter kann man daraus schließen, daß aus einfachen Replikationsgabeln, die am scherempfindlichen Verzweigungspunkt zerrissen werden, 2 lineare Fragmente entstehen, von denen eines immer noch das doppelte Molekulargewicht besitzt als ein Kryolysefragment von linearer DNA. Wie bereits mehrfach angesprochen ist das Kriterium der Nitrocellulosebindung von DNA-Fragmenten das Vorhandensein einsträngiger Abschnitte. Diese einsträngigen Anteile sind nicht nur in intakten Replikationsgabeln enthalten, sondern auch am Ende oder innerhalb der linearen Scherfragmente. Die NC-Bindung dieser linearen Scherfragmente von Replikationsgabeln, die im Elektronenmikroskop nicht als replizierende Struktur erkannt werden, ist wohl der Hauptgrund für das ca. 1,5 fache mittlere Molekulargewicht der NC bindenden Fragmente gegenüber den nicht bindenden (Tab 5.1: 1,43 /um : 0,945 = 1,51).

Neben laufenden Replikationsgabeln sind in beiden Experimenten Fragmente mit 2 Verzweigungspunkten zu erwarten, die frühe und späte Stadien eines Replikons repräsentieren. Auf die Schwierigkeiten bei der Unterscheidung von Initiationsstrukturen und Terminationsstrukturen wurde bereits hingewiesen. Im Gegensatz zu laufenden Gabeln, die im Durchschnitt zu ca. 1/3 neusynthetisierter DNA bestehen, enthalten Terminationsstrukturen im Durchschnitt 2/5 neusynthetisierte DNA und sollten deshalb im CsCl-Gradienten bei höheren Dichten ban-

dieren. Tatsächlich befinden sich insgesamt 4 der insgesamt 5 in Expt. 5.2 beobachteten Doppelgabeln in den Fraktionen zwischen schweren linearen Fragmenten und einfachen Gabeln (Tab. 5.2). Bei der Doppelgabel in Fraktion 8 kann es sich auch um eine Terminationsstruktur im Stadium der Wartezeit handeln, die nicht markiert wurde.
Das aus der Moleküllänge ermittelte Molekulargewicht $\bar{z}_5$ aller Doppelgabeln (Tab. 5.2) ist 4,18 mal größer als ein durchschnittliches lineares Fragment der nicht NC-bindenden Fraktion und kommt damit einem für die Kryolyse errechneten Erwartungswert von 4 (129) für Terminationsstrukturen sehr nahe.

Kleine Blasen (Minibubbles) wurden nur in einem einzigen Fall beobachtet. Der Grund ihres spärlichen Vorkommens liegt vermutlich in ihrer thermodynamisch instabilen Struktur. Die in den teilweise einsträngigen Blasen vorhandene neusynthetisierte DNA kann durch rückwärtige Gabelwanderung verdrängt werden, wobei die Parentalstränge sich wieder schließen können. Nach (10) wurde vollständiges Verschwinden von Minibubles in DNA Präparaten selbst bei 4°C Lagerung berichtet.
Die in den Vorbemerkungen angedeutete Anreicherung replizierender DNA-Strukturen gegenüber den nicht linearen Fragmenten hat sich somit als möglich erwiesen. War beim Mikroskopieren nicht angereicherter DNA nur nach ca. 700 /um eine Replikationsgabel zu erwarten, so wurden in der NC-bindenden Fraktion in Expt. 5.1 nach ca. 29 /um linearer Fragmente eine intakte Gabel beobachtet, und in Expt. 5.2 in Fraktion 6 des CsCl-Gradienten sogar nach 22 /um. Die entsprechenden nicht NC bindenden Kontrollfraktionen enthielten keine (Tab. 5.1) oder 0,5% Gabeln (Tab. 5.2).

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen über die Beziehung von inverted repeat Sequenzen (i.r.) zum Replikations-Ursprung (Initiationsstellen) in Ehrlich-Ascites-Tumorzellen durchgeführt. I.r. Sequenzen wurden von der Gesamt-DNA nach De- und Renaturierung bei cot-Werten von 10^{-4} durch Chromatographie an Hydroxylapatit abgetrennt.
Nach Aufhebung einer Initiationshemmung durch O_2-Entzug wurde neusynthetisierte DNA 5 Minuten Puls-markiert, und die in dieser DNA enthaltenen i.r.Sequenzen mit einer gleichmäßig ^{14}C-durchmarkierten DNA verglichen. Dabei zeigte sich, daß bei dieser "Spezifischen Markierung" der Initiationsregionen mehr i.r.Sequenzen markiert wurden, als in der ^{14}C-Referenz-DNA (1,34 bzw. 1,36 mal soviel; bei Berücksichtigung des radiolytischen Abbaus der DNA während der Aufarbeitung errechnet sich sogar ein "Anreicherungsfaktor" von 1,7).
Dies legt den Schluß nahe, daß in der nächsten Umgebung von Initiationsstellen vermehrt i.r.Sequenzen vorkommen.
Der von den gewählten Zeitwerten günstigste Zeitpunkt für die Markierung von i.r.Sequenzen lag bei 8 bis 10 Min. nach Aufhebung der Anaerobie.

Die i.r.Sequenzen enthaltenden DNA-Präparationen wurden elektronenmikroskopisch charakterisiert, die Stammlängen und Looplängen (Schleifen) der "Hairpin"-Moleküle (Haarnadelschleife) gemessen, und die Gesamtzahl von i.r.Sequenzpaaren für das Ascites-Genom errechnet:
Die mittlere Länge aller i.r. Sequenzpaare betrug 0,26 µm (0,78 kb), die mittlere Looplänge 0,57 µm (1,7 kb) bei einer mittleren Fragmentlänge von 2,2 µm. Die Gesamtzahl der i.r. Sequenzpaare pro m Ascites-DNA wurde mit 20.500 ermittelt, von denen wiederum 85% eine Loopschleife enthalten. Damit ergibt sich ein durchschnittlicher Abstand zwischen 2 i.r. Sequenzpaaren auf dem Ascites-Genom von 48 µm.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit befaßte sich mit der Anreicherung replizierender DNA gegenüber nicht replizieren-

der DNA und ihrer elektronenmikroskopischen Charakterisierung. Dazu wurde hochmolekulare Ascites-DNA mit schonenden Methoden gereinigt und durch Kryolyse nach Lyscov und Moshkovsky (21) fragmentiert. Aus der Masse der nichtreplizierenden Fragmente konnten replikative Strukturen aufgrund ihres partiellen Einstrangcharakters über Nitrocellulose-Chromatographie angereichert werden. Nitrocellulose-bindende DNA enthielt Fragmente mit einem Verzweigungspunkt (Y-Struktur), die als laufende Replikationsgabeln gedeutet wurden, Initiationsstrukturen (Bubbles) und Fragmente mit 2 Verzweigungspunkten (Abb. S. 95 und 97). Bei letzteren handelt es sich zum Teil um späte Initiationsstrukturen ("geplatzte Blasen") und um Terminationsstrukturen.

Die Anreicherung von replikativen Strukturen, insbesondere von einfach verzweigten Replikationsgabeln gegenüber linearen Fragmenten konnte durch Dichtemarkierung der DNA und isopyknische Zentrifugation noch verbessert werden. Y-förmige Strukturen bandieren erwartungsgemäß, - bei einem mittleren (schweren) Tochterstranganteil von 33% -, intermediär zwischen leichten, nicht markierten, linearen Fragmenten und schweren, linearen Fragmenten, die zur Hälfte aus neusynthetisierter DNA bestanden.

Sämtliche an Nitrocellulose bindenden Fragmente waren im Durchschnitt ca. 2 mal größer und die Y-Strukturen ca. 3 mal größer als die Fragmente der nicht Nitrocellulose-bindenden DNA. Diese gemessenen Molekulargewichte bestätigen entsprechende Erwartungswerte, die durch Wahrscheinlichkeitsrechnung zum Fragmentierungsmechanismus der Kryolyse ermittelt wurden (129). Da diese Erwartungswerte in einem Computermodell der DNA-Replikation zugrundegelegt wurden, ist ihre experimentelle Bestätigung für die Bewertung der Modellrechnungen von großer Wichtigkeit.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. De Pamphilis, M. L., Wassarman, P.M., (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 627-666
2. Ogawa, T., Okazaki, T., (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 627 - 666
3. Pardee, A.B., Dubrow, R., Hamlin J. L., Kletzien, R.F., (1978), Ann. Rev. Biochem. 47, 715-743
4. Sheinin, R., Humbert, J., Perlman, R.E., (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 277 - 316
5. Hubermann, J.A., Riggs, A.D., (1968), J. Mol. Biol. 32, 327 - 341
6. Taylor, J.H., (1960), J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 455-464
7. Hand, R.,(1975) J. Cell Biol. 64, 89-97
8. Blumenthal, A.B., Kriegstein, J. H., Hogness, D.S., (1974) Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 38, 205-223
9. Newlon, C.S., Petes, T.D., Hereford, L.M., Fangmann, W.L., (1974) Nature 247, 32-35
10. Baldari, C.T., Amaldi, F.,(1978) Cell 15, 1095-1107
11. Hand, R., (1978) Cell 15, 317-325
12. Edenberg, H.J., Hubermann, J.A., (1975) Ann. Rev. Genetics 9, 245-284
13. Hand, R., Tamm, I. (1974) J. Mol. Biol. 82, 175-183
14. Ockey, C.H., Saffhill R. (1976) Exp. Cell Res. 103, 361-373
15. Blütters, R.,(1978) Dissertation, Tübingen
16. Harland, R. (1981) TIBS 3, 71-74
17. Struhl, K., Stinchcomb, D.T., Scherer, S., Davis,R.W. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1035-1039
18. Stinchcomb, D.T., Thomas, M.,Kelly, J., Selker, E., Davis, R.W. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4559-4563
19. Wilson, D.A., Thomas, C.A.,(1974) J. Mol. Biol. 84, 115-144
20. Probst, H., Hofstaetter, T., Jenke, H., Gentner, P., Wais, R. (1974) Biochim. et Biophys. Acta 366, 11-22
21. Lyscov, V.N., Moshkovsky, Y.S. (1969) Biochim. et Biophys. Acta 190, 101-110
22. Karzel, K., (1965) Med. Pharmakol. Exp. 12, 137-142
23. Schindler, R., Day, M., Fischer, G.A.,(1965) Cancer Res. 19, 47-53
24. Probst, H., Maisenbacher, J. (1973) Exp. Cell Research 78, 335-344
25. Shapiro, J. (1969) Nature 224, 768-781

26. Schindler, R., Ramseier, L., Schaer, J.C., Grieder, A. (1970) Exp. Cell Res. 59, 90-102

27. Meyer, H. (1978) Biochem. Diplomarbeit, Tübingen

28. Schwochau, M. (1979) GIT 23, 357-360, und 1011-1022, oder Sonderdruck der Fa. Beckman Instruments GmbH, Report 2,79

29. Rhoades, M. (1975) Virol. 64, 170-179

30. Corneo, G., Ginelli, E. (1968) Biochemistry 7, 4373-4379

31. Handbook ob Biochemistry, Selested Data of Molecular Biologie (1970), 2nd Edition, Ed. Sober, H.A., Chemical Rubber Comp. Cleveland, USA

32. Probst, H., Ullrich, A., Krauss, G. (1971) Biochim. et Biophys. Acta 254, 15-29

33. Britten, R.J., Graham, D.E., Neufeld, B.R. (1974) Methods in Enzymol. 29E, Herausgeber: Grossmann, L., Moldave, K., Academic Press, New York, 363-408

34. Chen, P.S., Toribara, T.Y., Warner, H. (1956), Anal. Chemistry 28, 1756-1758

35. Kram, R., Botchan, M., Hearst, J.E. (1972) J. Mol. Biol. 64, 103-117

36. Kowalski, J., Chevers, W.P., (1976) J. Mol. Biol. 104, 603-615

37. Studier, F.W., (1965) J. Mol. Biol. 11,373-390

38. Johnson, P.H., Grossmann, L.I. (1977) Biochemistry 16, 4216-4224

39. Johnson, P.H., Miller, M.J., Grossmann L.I. (1980) Anal. Biochem. 102, 159-162

40. Bäzner, S., (1978) Biochem. Diplomarbeit, Tübingen

41. Banfield Younghusband, H., Inman, R.B. (1974) Ann. Rev. Biochem. 605-619

42. Evenson, D.P. (1978) Methods in Virol. 6, 219-264

43. Fisher, H.W. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 646-676

44. Hamkalo, B.A. (1973) Ann. Rev. Biochem. 42, 379-396

45. Marusyk, R., Sergeant, A. (1980) Anal. Biochemistry 105, 403-404

46. Davis, W., Simon, M., Davidson, N. (1971) Methods in Enzymol. 21 D, Herausgeber Grossmann, L., Moldave, K., Acacemic Press, New York, 413-428

47. Inman, R.B., Schnös, M. (1970), J. Mol. Biol. 49, 93-98

48. Lang, D., Bujard, H., Wolff, B., Russel, D., (1967) J. Mol. Biol. 23, 161-181

49. Lang, D., Mitani, M. (1970) Biopolymers 9, 373-379

50. Mayor, H.D., Jordan, L.E. (1968) Science 161, 1246-1247

51. Greiner, K. (1981) Zulassungsarbeit für das Lehramt an Höheren Schulen, Stuttgart

52. Fratermann, A. (1978), Dissertation, Tübingen

53. Thomas, M., Davis, R.W. (1975) J. Mol. Biol. 91, 315-328

54. Helling, R., Goodmann, H., Boyer, H. (1974), J. of Virol. 14, 1235-1244

55. Hershey, A.D., Burgi, E., Ingraham, L. (1963) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49, 748-755

56. Aaij, C., Borst, P. (1972) Biochim. Biophys. Acta 269, 192-200

57. Bearden, J.C. (1979) Gene 6, 221-234

58. Southern, E.M. (1979) Analytical Biochem. 100, 319-323

59. Schaffer, H.E., Sederoff, R.R. (1981) Analytical Biochem. 115, 113-122

60. Burgi, E., Hershey, D. (1963) Biophysical Journal 3, 309-321

61. Easan, R., Campbell, A.M. (1978) in Centrifugal Separations in Molecular and Cell Biology, Herausgeber Birnie, G.D., Rickwood, D., Verlag Butterworth, London, 250-287

62. Chon, L. T., Scott, J.M., Broker, T.R. (1975) Labormanual aus Cold Spring Harbour, unveröffentlicht

63. Lang, D., Bujard, H., Wolff, B., Russel, D. (1967) J. Mol. Biol. 23, 163-181

64. Lyscov, V.N. (1969) Biochim Biophys. Acta 190, 111-115

65. Malamy, M., Fiandt, M., Szybalsky, W. (1972) Mol. Genet. 119, 207-222

66. Pfeiffer, W., Hörz, W., Igo-Kemenes, T., Zachau, H.G. (1975) Nature 258, 450-452

67. Igo-Kemenes, T., Greil, W., Zachau, H.G. (1977) Nucleic Acid Res. 4, 3387-3400

68. Creusot, F., Christman, J.K. (1980) Anal. Biochem. 103, 343-349

69. Freidenrich, S., Hand, R. (1981) Analytical Biochem. 115, 231-235

70. Streeck, E., Zachau, H.G. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 267-279

71. Moore, K.H., Johnson, P.H., Chandler, S.E., Grossmann, L.I. (1977) Nucleic Acid Res. 4, 1273-1289

72. Hamer, D.H., Thomas, C.A. (1974) J. Mol. Biol. 84, 139-144

73. Kleinschmidt, A.K. (1968), Methods in Enzymol. 12 B, Herausgeber Moldave, K., Grossmann, L., Academic-Press, New York 361-377

74. Jelinek, W. (1979) in Alfred Benzon Symposion 13, Herausgeber Jan Engberg, København, 406-423

75. Cohen, S.N., Kopecko, D.J. (1976) Fed. Proc. 35, 2031-2042

76. Panayotatos, N., Wells, R.D. (1981) Nature 289, 466-470

77. Arai, K., Kornberg, A. (1981) in Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. 26, Herausgeber Cohn, W., Academic Press, New York, 33-48

78. Hirota, Y. (1981) im selben Band wie (77), 33-48

79. Klessig, D.F. (1977) Cell 12, 9-21

80. Tattersall, P., Ward, D. (1976) Nature 263, 106-109

81. Straus, S.E., Sebring, E.D., Rose, J.A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 742-746

82. Jelinek, W.R., Toomey, T.P., Leinwand, L. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, No.3, 1398-1404

83. Fareed, G.C., Davoli, D. (1977) J. Mol. Biol. 46, 471-522

84. Hsu, M.T., Jelinek, W.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, No.4, 1631-1634

85. Chow, L., Gelinas, R.E., Broker, T.R., Roberts, R.J. (1977) Cell 12, 1-8

86. Sheldrick, P., Berthelot, N. (1974) Cold Spr. Harb. Symp. on Quant. Biol. 39, 667-677

87. Hayward, S.D., Kieff, E. (1977) J. Virol. 23, 421-429

88. Garon, C.F., Barbosa, E., Moss, B. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, No. 10, 4863-4867

89. Wittek, R., Barbosa, E. (1980) Nature 285, 21-25

90. Wittek, R., Menna, A. (1978) J. of Virol. 28, No. 1, 171-181

91. Cohen, J.E., Jasny, B.R., Tamm, I. (1979) J. Mol. Biol. 128, 219 - 245

92. Jasny, B.R., Cohen, J.E., Tamm, I. (1978) in DNA Synthesis: Present and Future, Herausgeber Kohijama, M., Molinaux, I., Plenum Press, New York, 175-188

93. Tamm. I., Jasny, B.R., Cohen, J.E. (1979) in Alfred Benzon Symposion 13, Herausgeber Jan Engberg, København 221-226

94. Jelinek, W.R. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, No.6, 2679-2683

95. Bollum, F.J. (1975) Progress in Nucleic Acid. Res. and Mol. Biol., Herausgeber Cohn, W., Academic Press, New York, 109-144

96. Hardman, N., Jack, P.L., Brown, A.J.P. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 179-184

97. Baldari, C.T., Amaldi, F. (1976) Chromosoma 59, 13-22

98. Pearlmann, S., Philips, C. (1976) Cell 8, 33-42

99. Callan, H.G., (1972) Proc. R. Soc. Lond. B. 181, 19-41

100. Manning, J.E., Schmid, C.W. (1975) Cell 4, 141-155

101. Schmid, C.W., Manning, J.E., Davidson, N. (1975) Cell 5, 159-172

102. Hardmann, N., Bell, A.J., Mc Lachlan, A. (1979) Biochim-et Biophys. Acta 564, 372-389

103. Cech, T.R., Hearst, J.E. (1975) Cell 5, 429-446

104. Georgiev, G.P. (1973) Cold Spr. Harb. Symp. on Quant. Biol. 38, 869-884

105. Probst, H., Blütters, R., Fielitz, J. (1980) Exp. Cell Res. 130, 1-13

106. Deininger, P.L., Schmid, C. W. (1976) J. Mol. Biol. 106, 773-790

107. Dott, P.J., Chuang, C.R. (1976) Biochemistry 15, No.18, 4120-4125

108. Jelinek, W.R. (1977) J. Mol. Biol. 115, 591-601

109. Probst, G. (1972), Dissertation, Tübingen

110. Flamm, W.G., Mc. Callum, M., Walker, P.M.B. (1967) Biochemistry 57, 1729-1734

111. Ginelli, E., Lernia, R.D., Corneo, G. (1977) Chromosoma 61, 215-226

112. Daune, M., Decker, C.A., Schachmann, H.K. (1966) Biopolymers 4, 51-76

113. Bloomfield, V.A., Crothers, D.M., Tinoco, I. (1974) in Physical Chemistry of Nucleis Acids, Harper & Row, New York, Evanston, 422-429

114. Jensen, R.H., Davidson, N. (1966) Biopolymers 4, 17-32

115. Szybalsky, W. (1968), Methods in Enzymol. 12 B, Herausgeber Colowick, S.D., Kaplan, N.O., Academic Press, New York, 330-360

116. Spragg, P. im selben Band wie (61), 7-32

117. Probst, H., Hofstaetter, T., Jenke, H., Gentner, P.R. (1976) Biochim et Biophys. Acta 442, 58-65

118. Miyazawa, Y., Thomas, C.A., (1965) J. Mol. Biol. 11, 223-244

119. Marmur, J., Ts'o, P.O.P. (1961), Biochim. Biophys. Acta 51, 32-42

120. Bonner, J., Kung, G., Bekhor, I. (1967) Biochemistry 6, 3650 - 3672

121. Mc Conaughy, B.L., Laird, C.D., Mc Carthy, B.J.(1969) Biochemistry 8, 3289-3295

122. Probst, H., Gekeler, V. (1980) Biochem. and Biophys. Res. Cummunications 94, 55-60

123. Zakian, V.A. (1976) J. Mol. Biol. 108, 305-331

124. Grummt, F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371-375

125. Helftenbein, E. (1982), Dissertation, Tübingen

126. Feller, W. (1971), An Introduction to Probability Theory and its Application, Vol. 11, 2nd edn, John Liley and Sons, Inc. New York

127. Lang, D., Kleinschmid, A.K., Zahn, R.K. (1964), Biochim. Biophys. Acta 88, 142-154

128. Weidle, U. (1975), Biochem. Diplomarbeit, Tübingen

129. Wais, R., Probst, H. (1979) Biochim.et Biophys. Acta 561, 147-154

130. Wais, R., Fraterman, A., Probst, H. (1979) Z. Physiol. Chemie 360, 395-396

Lebenslauf

Am 15. 10. 1951 wurde ich, Siegmar Bäzner, als Sohn von Renate und Rudi Bäzner in Pforzheim-Eutingen geboren. Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule in Eutingen, von 1962 bis 1967 das naturwissenschaftliche Kepler-Gymnasium in Pforzheim und von 1967 an das Fritz-Erler-Wirtschaftsgymnasium, an dem ich 1970 mein Abitur ablegte.
Im Sommersemester 1971 begann ich an der Universität Tübingen das Studium der physiologischen Chemie, das 1972 bis 1973 durch die Ableistung des Zivilen Ersatzdienstes unterbrochen wurde. Vom SS 1977 bis zum SS 1978 war ich an der Universität München immatrikuliert, und arbeitete in mehreren Arbeitsgruppen im Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit. Das Vordiplom legte ich im April 1975 ab, die Diplomhauptprüfung im November 1977. Der experimentelle Teil der Diplomarbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. H. Probst bis zum Oktober 1978 fertiggestellt.
Seit 15.4.1977 bin ich mit der griechischen Staatsbürgerin Filareti Bäzner-Sidiropoulou (cand. med.) verheiratet, und wir erfreuen uns inzwischen der Geburt zweier Töchter: Eva Irene (3.11.1977) und Iris-Daphne Parascevi (4.2.1981).

Seit Oktober 1978 arbeitete ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. H. Probst an meiner Dissertation mit dem Thema: "Biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen über replikative Strukturen in der DNA von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen", die ich im Februar 1982 beendete.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, F. Lynen, T. Bücher, G. Zachau, K. Klingenberg, D. Mecke
Molekularbiologie	H. Gross, K. Hannig, P.H. Hofschneider H. Probst, W. Zillig.
Proteinchemie	G. Braunitzer, K. Kühn.
Zellbiologie	B. Hamprecht
Genetik	W. Seyffert
Mikrobiologie	H. Zähner
Physiologie	E. Betz, R. Jacob, H. Metzner
Pharmakologie	H. Remmer, M. Siess
Physikalische Chemie und Biochemie	H. Mauser, W. Braun, K. Wegmann, W. Zeil
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer, M. Hanack
Anorganische Chemie	W. Rüdorff, E. Stumpp
Zoologie	K.G. Grell
Botanik	H. Metzner
Anatomie	K. Mörike
Physik	H. Krüger
Strahlenschutzkunde	U. Feine
Mathematik	K. Bayer, K. Dellmann
Statistik	O. Anderson

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/64321